FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1960 - N° 10

ETUDE DE LA DÉGRADATION ET DE LA STABILISATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE EN SOLUTION AQUEUSE

THÈSE

présentée

à la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement

le 26 Février 1960

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Claude NOFRE

Né le 28 Juin 1931, à MARMANDE (Lot-et-Garonne)

F. ANDRÉ
5, Rue Bugeaud
LYON

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1960 - N° 10

ETUDE DE LA DÉGRADATION ET DE LA STABILISATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE EN SOLUTION AQUEUSE

THÈSE

présentée

à la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement

le 26 Février 1960

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Claude NOFRE

Né le 28 Juin 1931, à MARMANDE (Lot-et-Garonne)

F. ANDRÉ
5, Rue Bugeaud
LYON

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

***

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE
Doyen Honoraire

M. H. HERMANN
Doyen - Correspondant de l'Institut

M. M. LEVRAT : Assesseur

*
* *

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS ; COLLET ; GUIART ; CADE ; PATEL ; LEPINE ; TRILLAT ; MOURIQUAND ; MAZEL ; GARIN ; GATE ; MARTIN ; GABRIELLE ; SANTY.

*
* *

PROFESSEURS

MM.	HERMANN	Physiologie
	CIBERT	Clinique Urologique
	PONTHUS	(détaché à Beyrouth) - Physique biologique, radiologie , physiothérapie
	DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale
	ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
	SEDALLIAN	Clinique des maladies infectieuses et bactériologie
	CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
	WERTHEIMER	Clinique chirurgicale
	DELORE	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
	PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale
	FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaire
	CROIZAT	Clinique médicale
	ENSELME	Chimie biologique et médicale
	MALLET-GUY	Clinique chirurgicale
	GUILLEMINET	Clinique chirurgie orthopédique et chirurgie infantile
	REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
	POLLOSSON	Clinique gynécologique
	PIGEAUD	Clinique obstétricale
	BOURRET	Médecine du travail
	LEVRAT	Clinique médicale
	SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale

Professeurs (suite)

MM.	DUCLOS	Clinique stomatologique
	BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du ler âge
	JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
	METIEN	Botanique et cryptogamie
	BERTRAND	Clinique chirurgicale
	BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
	DREVON	Pharmacie et Pharmacologie
	ROCHE	Médecine légale et déontologie
	COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
	MOUNIER-KUHN	Clinique oto-rhino-laryngologique
	PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
	THIERS	Clinique dermatologique et syphiligraphique
	BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
	CREYSSEL Jean	Clinique traumatologique des membres
	DARGENT	Cancérologie
	GUICHARD	Anatomie pathologique
	GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
	LATARJET	Anatomie
	PEYCELON	Pathologie chirurgicale
	GIRARD Marcel	Thérapeutique
	VACHON	Pathologie médicale
	GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
	X	Histologie

*
* *

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

M.	BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine

*
* *

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

MM.	BANSSILLON	Obstétrique
	ROMAN	Parasitologie
	BERTOYE	Bactériologie
	CIER J.François	Physiologie
	CHATONNET	Physiologie
	DORCHE	Pharmacie galénique et matière médicale

*
* *

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.	PERROT Louis	Chimie organique et toxicologie
	FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique
	CIER André	Pharmacie et pharmacologie
	CREYSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
	DUROUX Emile	Anatomie
	BRETTE René	Thérapeutique
	DUMONT Louis Prosper	Histologie
	THIVOLET Jean	Hygiène
	GARIN Jean Paul	Parasitologie
	MORET Robert	Physique
	ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie

*
* *

AGREGES EN EXERCICE

MM.	LECUIRE	Chargé d'enseignement	Neuro-chirurgie
	GONIN André	d°	Cardiologie
	MATHIEU Jacques		Obstétrique
	MARION Joseph		Orthopédie
	PONT Maurice	Chargé d'enseignement	Propédeutique médicale
	VIGNON Georges	d°	Pathologie médicale
	REVOL Louis	d°	Pathologie médicale
	JAUBERT de BEAUJEU	d°	Pathologie chirurgicale
	TRAEGER Jules	d°	Médecine générale
	GUILLEMIN Georges	d°	Pathologie chirurgicale
	PAPILLON Jean	d°	Electro-radiologie
	BURTHIAULT René	d°	Obstétrique
	FRANÇOIS René	d°	Pédiatrie, Puériculture
	GUINET Paul		Médecine générale
	SAUTOT Jean		Pathologie chirurgicale
	MARION Pierre		Chirurgie générale
	MICHAUD Pierre		Chirurgie générale
	MONNET Paul		Maladies infectieuses
	GIGNOUX Marcel		O.R.L.
	FREIDEL Charles		Stomatologie
	PLAUCHU Marcel		Médecine générale
	DEVIC Michel	Chargé d'enseignement	Pathologie médicale
	COLIN Marcel	d°	Médecine légale
	GUYOTAT Jean	d°	Neurologie
	DUMONT Martial	d°	Obstétrique
	DURAND Louis Noël	d°	Urologie
	FRANCILLON Jacques	d°	Chirurgie générale
	DESPIERRES Charles		Médecine générale
	de MOURGUES Georges		Chirurgie générale
	SAUBIER Eugène		Chirurgie générale
	COLOMB Daniel		Dermatologie
	TOLOT François		Médecine du travail
	SCHOTT Bernard		Neurologie Psychiatrie
	BONAMOUR Georges		Ophtalmologie

***

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. DREVON, Président ; REVOL, Professeur ; PERROT, Professeur Agrégé ; CIER, Professeur Agrégé.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550014_0039

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde
affection et de ma gratitude.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur B. DREVON

En nous faisant l'honneur de nous accueillir dans son laboratoire, il nous a permis d'accomplir ce travail dont il a été l'instigateur. Il nous donne encore une nouvelle preuve de sa bienveillance en acceptant de présider notre Thèse. Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur L. REVOL

Tout au long de nos études nous avons souvent bénéficié de son enseignement et de sa bienveillance. Il nous fait aujourd'hui l'honneur d'être notre Juge. Nous voudrions lui présenter ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé L. PERROT

Au cours de nos recherches nous nous sommes maintes fois référé à ses travaux se rapportant à l'acide ascorbique. Nous sommes aussi très heureux de le compter parmi nos Juges. Nous l'en remercions très respectueusement.

Monsieur le Professeur Agrégé A. CIER

Il a été pour nous le guide, le conseiller de chaque jour. Il ne nous a ménagé ni son temps, ni sa peine. Nous ne saurions,en quelques mots lui exprimer toute notre reconnaissance. Nous le prions de bien vouloir trouver ici un modeste témoignage de notre attachement et du dévouement que nous espérons pouvoir lui prouver.

A NOS MAITRES ET A NOS CHEFS

DU SERVICE DE SANTE MILITAIRE

En hommage respectueux.

P L A N D U T R A V A I L

- INTRODUCTION

- PARTIE I : Généralités

  - Chapitre I - 1 : Propriétés physico-chimiques de l'acide L-ascorbique
  - Chapitre I - 2 : Facteurs d'oxydation et mécanisme
  - Chapitre I - 3 : Dégradation
  - Chapitre I - 4 : Stabilisation

- PARTIE II: Travail personnel

  - Chapitre II - 1: Dégradation en atmosphère inerte
  - Chapitre II - 2: Dégradation oxydative
  - Chapitre II - 3: Stabilisation
  - Chapitre II - 4: Discussion des résultats

- CONCLUSION

- BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

Si son importance biologique et son intérêt thérapeutique ne sont plus à souligner, l'activité de l'acide ascorbique procède d'un mécanisme encore obscur, malgré la somme de travaux qui lui sont consacrés depuis plus de trente ans.

Toutefois, des recherches récentes ont mis en lumière des propriétés inattendues de cette vitamine : à côté du concept classique, émis pas SZENT-GYORGYI, du rôle joué par le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, fait place aujourd'hui le concept, paradoxal en apparence, de son rôle oxydant. Nous ne discuterons pas ici cette dernière théorie qui sort du cadre de ce travail, mais il convient cependant de signaler la place qu'elle réserve aux produits de dégradation de l'acide ascorbique.

La nature de ces métabolites est encore mal connue. La complexité du phénomène explique en partie les échecs éprouvés au cours des recherches effectuées sur le métabolisme de cet acide et l'on conçoit, dès lors, l'intérêt que représente l'étude de sa dégradation in vitro pour la connaissance des processus biologiques dont il est responsable.

De telles investigations offrent aussi un intérêt galénique : stabiliser les solutions aqueuses d'acide ascorbique demeure l'un des problèmes auxquels se heurte l'industrie pharmaceutique. Les solutions proposées ne donnent pas toujours satisfaction; elles sont généralement empiriques et l'on peut penser que préciser le mécanisme de l'évolution dégradative et déterminer les produits qui en résultent permettraient de remédier de façon plus efficace au processus de dégradation.

Ces diverses données ont orienté nos recherches. La première partie de ce travail est une mise au point sur les propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique et les recherches antérieures ayant trait à l'étude de sa dégradation et de sa stabilisation.

Nos travaux personnels font l'objet de la seconde partie.

Ils sont présentés en trois chapitres dans lesquels sont traités séparément la dégradation en atmosphère inerte, la dégradation oxydative et la stabilisation de l'acide ascorbique. Un dernier chapitre, essai d'interprétation des résultats, précède les conclusions que nous avons cru pouvoir tirer de ces recherches.

P A R T I E I

GENERALITES

CHAPITRE I - 1

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE L-ASCORBIQUE

A - PROPRIETES STRUCTURALES

1) Structure moléculaire

L'acide L-Ascorbique, de formule brute $C_6H_8O_6$, (PM = 176,12) est la γ- lactone de l'acide L (+) pentahydroxy-2,3,4,5,6, hexène - 2, oïque - 1 (70) (fig. 1). Les atomes de carbone et d'oxygène sont situés sur un même plan (structure coplanaire), à l'exception du carbone 5 qui se trouve à moins de 1 Å en dehors (28).

2) Structure cristalline (28)

L'acide L - ascorbique cristallise dans le système monoclinique avec quatre molécules dans la maille, sans eau de solvation (dimensions de la maille : a = 16,95 Å; b = 6,32 Å, c = 6,38 Å, β = 102°5; groupe spatial = P 2_1 (c)).

B - PROPRIETES CONSTITUTIVES

1) Propriétés constitutives de la structure cristalline (28).

Il présente un point de fusion instantanée à 192°C avec décomposition Il est soluble dans les solvants polaires (1 gramme se dissout dans 3 ml d'eau, dans 50 ml d'éthanol anhydre à 20°C), insoluble dans les solvants faiblement polaires ou non polaires. Les indices de réfraction pour la raie D sont α = 1,476 , β = 1,594 , γ = 1,750. La réfraction moléculaire pour la même raie est de 34,7 (valeur calculée : 35,0). Sa densité est de 1,74.

2) Propriétés constitutives de la structure moléculaire

a) pouvoir rotatoire

La présence de deux carbones asymétiques (positions 4 et 5) confère à sa molécule un pouvoir rotatoire, qui est dextrogyre et variable avec le pH. En solution aqueuse, $[\alpha]_D^{20}$ est de + 23° (20,28,70), en solution méthanolique $[\alpha]_D^{18}$ de + 49° (77) pour l'acide ascorbique, de + 115° pour l'ascorbate monosodique et de + 200° pour l'ascorbate disodique en solution aqueuse (58).

b) propriétés spectrales

- spectre en ultra-violet (20)

La bande d'absorption dans l'ultra-violet est de position variable avec le pH. Aux pH $\leq$ 3,0 , la longueur d'onde d'absorption maximale (λm) est de 242,5 mμ; des pH 5,5 à 11,5 (structure mono-anionique), λm est de 264 mμ; aux pH $\geq$ 12,5 (structure di-anionique), λm est de 298 mμ. Le coefficient d'absorption moléculaire varie également avec le pH : à pH 0,1, εm est de 10^4 ; à pH 6,75, $\varepsilon_m \backsim 1{,}5 \cdot 10^4$; à pH 13,73, $\varepsilon_m \backsim 1{,}1 \cdot 10^4$. Les courbes ne se coupent pas en un point isobestique, et ce fait implique la présence de trois systèmes chromophores différents (fig. 1).

- spectre en infra-rouge (145)

Les nombres d'ondes obtenus avec l'acide ascorbique en solution

aqueuse sont respectivement de 1.280 , 1.330 , 1.610 , 1.700 et 2.500 cm^{-1}.

- spectre Raman(44)

Le spectre de diffusion de l'acide ascorbique laisse apparaître, à côté de nombreuses raies de faible intensité, une raie large et intense à 1.699 cm^{-1} qui passe, avec l'ascorbate de sodium, à 1.596 cm^{-1}, sans diminution de l'intensité relative. L'étude spectrale comparative du diénol de l'acide ascorbique et d'un énol structuralement voisin (acide tétronique), révèle que ce dernier ne présente, par salification, qu'une variation minime du nombre d'ondes (3 cm^{-1}), ce qui suggère la disparition, par scission protolytique de l'acide ascorbique, d'une structure chélatée bicyclique (fig. 1).

C - PROPRIETES CHIMIQUES

L'acide ascorbique est caractérisé par une chaîne glycolique, une fonction lactonique et un groupement diénolique, support essentiel de ses propriétés chimiques (propriétés protolytiques et oxydo-réductrices).

1) Propriétés protolytiques

Malgré l'absence d'un groupement carboxylique libre, l'acide ascorbique peut réagir en solution aqueuse, grâce à sa fonction diénolique (qui évolue entre deux formules limites mésomères) comme un diacide, en donnant suivant le pH, les individualités chimiques suivantes (cf. fig.1).

$$H_2A + H_2O \rightleftharpoons HA^- + H_3O^+$$

$$HA^- + H_2O \rightleftharpoons A^{2-} + H_3O^+$$

Les constantes de dissociation sont, selon BIRCH et HARRIS (14) : $K_1 = 6,77 \cdot 10^{-5}$ ($pK_1 = 4,17$) et $K_2 = 2,70 \cdot 10^{-12}$ ($pK_2 = 11,57$) ; selon KUMLER et DANIELS (86) : $K_1 = 7,56 \cdot 10^{-5}$ ($pK_1 = 4,12$) et $K_2 = 3,08 \cdot 10^{-12}$ ($pK_2 = 11,52$).

2) Propriétés oxydo-réductrices

L'acide ascorbique (H_2A) par transfert de deux électrons et libération de deux protons conduit à l'acide déhydroascorbique (A) suivant l'équation globale :

$$H_2A \longrightarrow A + 2e + 2H^+$$

Le problème de la réversibilité du système est encore discuté : le système est thermodynamiquement réversible pour certains auteurs (16, 52, 146), irréversible pour d'autres (62, 77, 87). De même, il n'existe pas, aujourd'hui encore, de valeur du potentiel normal de l'acide ascorbique universellement admise. Ces contradictions viennent du fait que le couple H_2A / A est un système évolutif, surtout aux pH > 5 (3), et qu'il peut apparaître, en fonction du pH, trois niveaux d'oxydation successifs (15) : un premier niveau d'oxydation à pH < 5,5, réversible; un second niveau des pH 5,5 à 7,5, à potentiel beaucoup plus bas que celui de l'acide ascorbique, et irréversible; enfin, un troisième niveau d'oxydation, à pH > 7,5 également irréversible. Les valeurs du potentiel normal apparent pour le premier degré d'oxydation (détermination électrométrique à 35°C) sont les suivantes (15) :

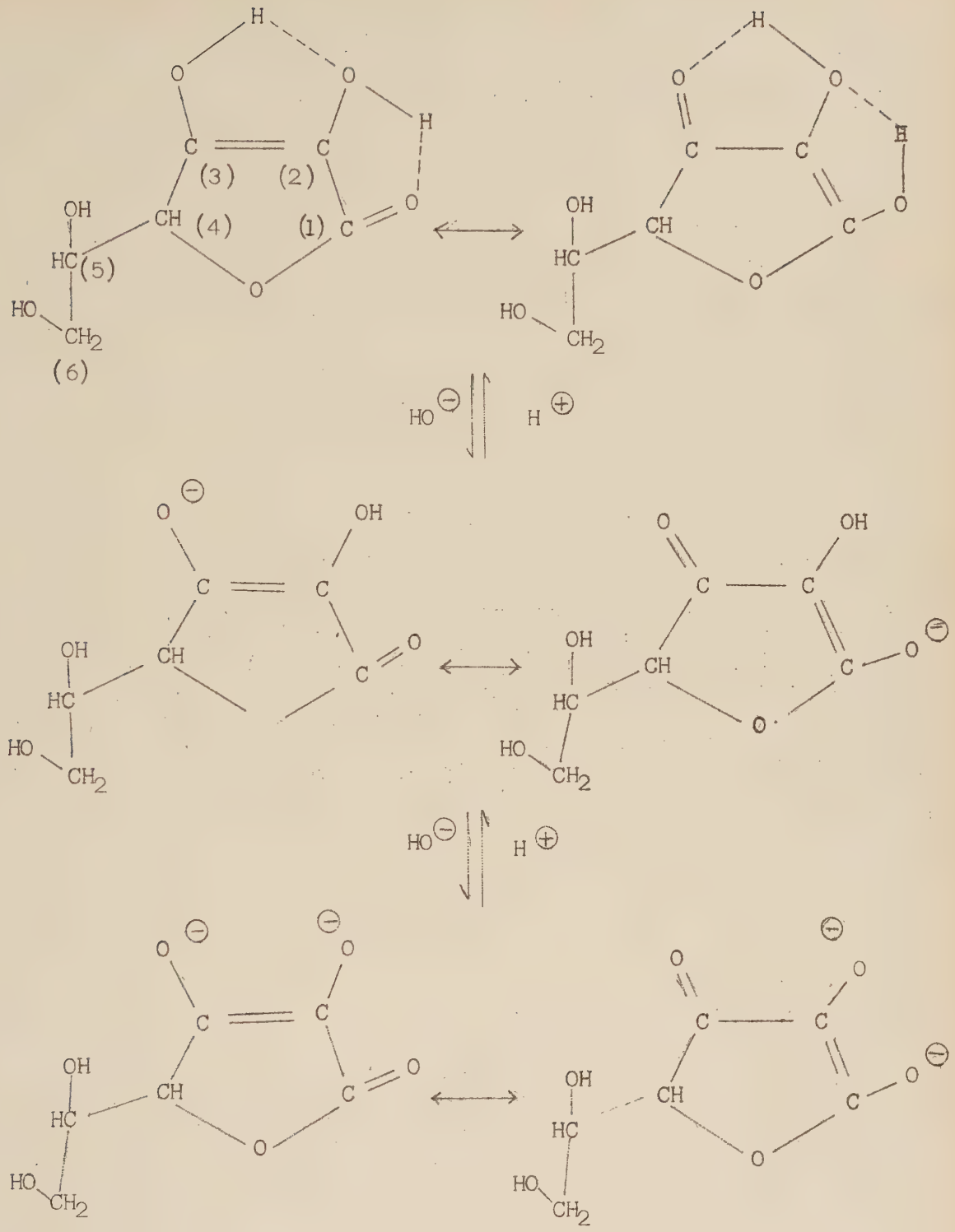


Figure I - Structures ioniques et mésomères de l'acide ascorbique.

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
E'o(mv)	+252	+223	+193	+166	+145	+127	+112

et pour le second degré d'oxydation (détermination colorimétrique à 35°C):

pH	5,5	6,0	6,5
E'o(mv)	+ 15	- 31	- 68

L'étude polarographique du système a aussi été effectuée (141). L'oxydation anodique n'est pas complètement réversible, et le potentiel de demi-vague (électrode normale au calomel) varie avec le pH :

pH	2,20	2,75	3,25	3,90	4,45
$E_{\frac{1}{2}}$(v)	+ 0,18	+ 0,15	+ 0,12	+ 0,08	+ 0,05
pH	4,85	5,60	6,65	7,30	8,30
$E_{\frac{1}{2}}$(v)	+ 0,02	- 0,02	- 0,06	- 0,08	- 0,11

Le système H_2A / A, au potentiel d'oxydo-réduction très faible, est susceptible de fournir des électrons aux couples rédox de potentiel supérieur. Il réduit à température ordinaire, les halogènes : de nombreux sels métalliques (133) : Au, Pd, Ag, Hg, Se, Cu en métal, Cr (VI) en (III), Mn (VII) en (II), Tl (III) en (I), Fe (III) en (II), V (V) en (IV), Mo (VI) en (V); des indicateurs rédox dont le 2,6 - dichlorophénol - indophénol, réactif courant de l'acide ascorbique. Les systèmes rédox de potentiel élevé, tels que Mn (VII), Cr (VI), les halogènes dismutés (X^+), oxydent l'acide ascorbique irréversiblement avec scission de la chaîne carbonée architecturale (130). L'oxydation par l'oxygène moléculaire fait l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE I - 2

FACTEURS D'OXYDATION ET MECANISME

A - FACTEURS D'OXYDATION

On peut distinguer cinq facteurs influençant l'oxydation de l'acide ascorbique en solution aqueuse : les facteurs chimique, catalytique, ionique, thermique et photochimique.

1) Facteur chimique

L'oxygène moléculaire, et en particulier l'oxygène dissous, est l'agent essentiel de l'oxydation de l'acide ascorbique. Il ne semble pas, cependant, qu'aux pH < 7,6, l'acide ascorbique puisse réagir directement avec l'oxygène moléculaire (6,80, 117); à ces pH, l'oxydation ne s'effectue que par l'intermédiaire de catalyseurs (oxydation catalytiquement induite). Aux pH > 7,6, l'oxydation a lieu, par contre, même en absence de catalyseurs (autoxydation ※) (6, 117). La réaction de l'oxygène est ainsi, sans catalyseur, 10^5 fois plus rapide avec l'anion divalent de l'acide ascorbique qu'avec l'anion monovalent (143); la vitesse de réaction de l'ion divalent est, dans ce cas, proportionnelle à la concentration en oxygène (143), celle de l'ion monovalent ne l'étant qu'en présence de catalyseur (144). Par induction catalytique, l'absorption d'oxygène est variable avec le pH : à pH acide, une molécule d'acide ascorbique réagit avec un atome d'oxygène (117). Des consommations plus élevées d'oxygène ont été signalées, aux pH alcalins (69) comme aux pH acides (34,75), avec, dans ce dernier cas, une accumulation de peroxyde d'hydrogène (34).

2) Facteur catalytique

Aux pH < 7,6, l'acide ascorbique n'est oxydé par l'oxygène moléculaire qu'en présence de catalyseurs. Ces catalyseurs sont des ions métalliques du type Me^{n+1}. Ils peuvent être classés (37) en fonction de leur efficacité décroissante dans l'ordre suivant :

$$Cu \gg Ag \gg Mn \gg Ni \gg Fe \gg Co$$

Cet ordre démontre que l'action catalytique ne dépend pas des potentiels d'oxydo-réduction (37). Les cations les plus importants, d'après leur fréquence, sont les ions cuivriques et ferriques. L'activité des sels de cuivre se manifeste encore puissamment à des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M, et la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique est proportionnelle à la racine carrée de la concentration en ion cuivrique (19,75). Seul l'anion monovalent de l'acide ascorbique est le substrat de la catalyse par le cuivre; ni l'acide ascorbique non ionisé, ni la structure di-anionique ne réagissent d'une façon appréciable à la ...

※ A proprement parler, il n'y a donc "autoxydation" qu'aux pH alcalins; ce terme est cependant d'un emploi courant dans la littérature, et conformément à l'usage nous l'utiliserons pour le cas même "d'oxydation catalytiquement induite".

catalyse au cuivre (144). L'ion ferrique ne présente une activité catalytique qu'aux pH < 5 (75,97); aux pH voisins de la neutralité, il exerce une action légèrement inhibitrice sur la catalyse cuivrique (75).

Un processus voisin de la catalyse cuivrique est réalisé, en biochimie végétale, par un facteur enzymatique exercé par une protéine cuivrique (ácide ascorbique - oxydase), généralement extraite des jus de courge ou de concombre. Aucun système de ce type n'a été signalé dans le règne animal. L'acide ascorbique-oxydase de la courge a un poids moléculaire de 146.000 et contient six atomes de cuivre par molécule (43). En présence d'acide ascorbique, la couleur bleue initiale de la protéine disparaît, et n'est rétablie que par oxygénation (43). Des pH 5,4 à 7,6, et à 38°, la constante de Michaelis pour l'oxydation de l'acide ascorbique avec l'oxydase est de 2.10^{-3} M, cette constante est abaissée à 1.10^{-3} M avec le cuivre inorganique (126). L'acide ascorbique-oxydase est inhibée par la 8 - hydroxyquinoléine, le cyanure de potassium, le diéthyldithiocarbamate de sodium, la thiourée (96,126). Elle manifeste enfin quelques propriétés oxydantes vis à vis d'autres substrats à structure diénolique tels que les acides D - isoascorbique, D - glucoascorbique, réductique (36). Le mécanisme d'action de l'acide ascorbique - oxydase n'est pas encore élucidé. L'étude de systèmes modèles (complexes protéino-cuivriques) a été jusqu'ici décevante, les protéines exerçant le plus souvent une action fortement inhibitrice sur la catalyse inorganique (105). Seules, parmi les diverses protéines étudiées, la fibrine (105) et l'insuline (106) révèlent, en présence d'ion cuivrique, une certaine activité oxydasique. Toutefois, le fait qu'à la chélation de l'ion cuivrique par l'histidine (106), de l'ion ferreux par le pyrocatéchol, l'indigosulfonate de sodium (107) ou l'éthylène diamine tétracétate disodique (23) succède un renforcement de l'activité catalytique respective de chacun de ces ions métalliques, laisse envisager la participation, au niveau de la protéine, d'une structure chélatante favorable à une activation cuivrique.

3) Facteur ionique

Un facteur important réside dans le pH de la solution. Nous l'avons vu, plus haut, en l'absence de catalyseur l'oxydation de l'acide ascorbique en présence d'oxygène est fonction du pH, c'est-à-dire de l'ionisation de sa molécule, et l'activité même des catalyseurs est sous la dépendance de ce facteur. On a estimé que la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique est inversement proportionnelle au carré de la concentration en ion hydrogène (34). Cependant, le processus autoxydatif ne peut, semble-t-il, se réduire à une loi aussi simple, l'influence du pH ne s'exerçant pas d'une façon uniforme sur la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique (31). Si entre des limites de pH de 2 à 5,2, on assiste à une augmentation régulière et rapide de la vitesse d'oxydation, dès le pH 5,2 apparaît, paradoxalement, un brusque ralentissement de la réaction, constant jusqu'au pH 7,6, accentué des pH 7,6 à 10. Au delà du pH 10, la vitesse s'accroît, elle est maximale à pH 11,8 (31).

4) Facteur thermique

La chaleur augmente la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique. Toutefois, le coefficient thermique de la réaction est relativement faible; Q_{10} est égal à 1,65 (6), coefficient voisin de celui de l'oxydation de l'ion cuivreux (40), ce qui semble indiquer que la réoxydation de l'ion

cuivreux en ion cuivrique est la réaction qui gouverne l'oxydation de l'acide ascorbique (6). Il a été en outre signalé une variation du coefficient thermique en fonction du pH (75).

5) Facteur photochimique

L'acide ascorbique en solution aqueuse subit, par irradiation ultra-violette, une décomposition photochimique. Les longueurs d'onde des radiations efficaces sont situées, soit à 1849 Å, zone de la photolyse de l'eau (65), soit à 2.537 Å, zone d'absorption sélective des radiations électromagnétiques par l'acide ascorbique (140). En centrant sur l'une ou l'autre de ces longueurs d'onde, deux types de réaction ont pu être observées (39, 64) suivant la présence ou non d'oxygène. En absence d'oxygène, se produit un dégagement d'hydrogène moléculaire, dû probablement à la scission homolytique de molécules d'eau activées, suivi d'une oxydation par le radical hydroxyle de l'ion ascorbique en radical ascorbyle qui réagirait à son tour avec l'atome libre hydrogène pour conduire à l'acide déhydroascorbique et à l'hydrogène moléculaire (39) (x) :

$$HA^- \; H^+ \; (H_2O) \xrightarrow[1849\ Å]{h\nu} HA^- \; H^+ \; (HO.H.) \rightarrow H_2O + HA. + H. \rightarrow A + H_2$$

En présence d'oxygène, la photoxydation de l'acide ascorbique s'accompagne de la formation de peroxyde d'hydrogène, par transfert successif de deux électrons à l'oxygène moléculaire (39).

$$HA^- \; H^+ + O_2 \xrightarrow[2537\ Å]{h\nu} HA. \; H^+ \; O_2^- \longrightarrow A + H_2O_2$$

Les rayons γ induisent également l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire; BARR et KING (5) ont proposé le mécanisme suivant :

(1) $H_2O \xrightarrow{h\nu} H. + HO.$

(2) $H. + O_2 \longrightarrow HO_2.$

(3) $H_2A + HO. \longrightarrow H_2O + HA.$

(4) $H_2A + HO_2. \longrightarrow H_2O_2 + HA.$

(5) $HA. + O_2 \longrightarrow HAO_2.$

(6) $HAO_2. + HA. \longrightarrow 2A + H_2O_2$

(Σ) $2H_2A + 2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2A + 2H_2O_2$

(x) Les abréviations suivantes seront utilisées dans le texte : H_2A : acide ascorbique; HA^- : ion monovalent de l'acide ascorbique; A2- : ion bivalent de l'acide ascorbique; HA. radical libre ascorbyle (acide monodéhydroascorbique); A : acide déhydroascorbique; HAO_2 : radical peroxyascorbyle.

B - MECANISME DE L'OXYDATION CATALYTIQUE

Le processus exact de l'oxydation catalytique de l'acide ascorbique n'est pas encore entièrement élucidé. S'il est admis que les ions du type Me^{n+1} (Cu^{2+}, Fe^{3+}, ...) interviennent par transfert d'électron, le mécanisme intime est lui-même discuté.

Il convient tout d'abord de rappeler succinctement les faits fondamentaux qui ont été expérimentalement obtenus :

a) aux pH $<$ 7,6, l'acide ascorbique ne peut pas réagir directement avec l'oxygène moléculaire. Il ne peut donc y avoir à ces pH qu'une oxydation catalytiquement induite.

b) Seul l'anion monovalent de l'acide ascorbique (HA^-) est le substrat de la catalyse au cuivre.

c) La quantité d'oxygène consommé lors de l'oxydation catalytique est toujours supérieure à la quantité théorique, ce qui s'explique par une accumulation de peroxyde d'hydrogène (6,34), et conduit à admettre la réaction globale : $H_2A + O_2 \longrightarrow A + H_2O_2$, préférentiellement à l'équation initiale : $H_2A + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow A + H_2O$.

d) enfin, il a été démontré (11, 13, 39, 56, 143) qu'au cours de l'oxydation catalytique intervient une étape radicalique transitoire, l'acide monodéhydroascorbique (HA.), présentant un niveau d'oxydation intermédiaire entre l'acide ascorbique (H_2A) et l'acide déhydroascorbique (A).

Si ces faits expérimentaux sont bien admis, le problème demeure de savoir si l'oxygène agit par réoxydation de l'ion cuivreux ou par attaque d'un intermédiaire radicalique de l'acide ascorbique.

1) Mécanisme par autoxydation de l'ion cuivreux

Se basant sur l'analogie des coefficients thermiques d'oxydation de l'acide ascorbique et de l'ion cuivreux, BARRON et coll. (6) ont proposé un mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique par les ions cuivriques avec transfert de deux électrons, suivi d'une autoxydation du cuivre monovalent par l'oxygène moléculaire et apparition consécutive de peroxyde d'hydrogène :

$$(1) \quad H_2A + 2\,Cu^{2+} \longrightarrow A + 2\,Cu^{+} + 2H^{+}$$

$$(2) \quad 2Cu^{+} + 2H^{+} + O_2 \longrightarrow 2Cu^{2+} + H_2O_2$$

$$(\Sigma) \quad H_2A + O_2 \longrightarrow A + H_2O_2.$$

Un mécanisme semblable, mais à étape ionique et radicalique a été émis par NORD (111), sans envisager toutefois la formation du peroxyde d'hydrogène :

$$(1) \quad HA^- H^+ + Cu^{2+} \longrightarrow Cu^{+} + H^{+} + HA.$$

$$(2) \quad HA. \longrightarrow A^- + H^+$$

$$(3) \quad A^- + Cu^{2+} \longrightarrow A + Cu^{+}$$

$$(4) \quad 2Cu^{+} + 2H^{+} + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow 2\,Cu^{2+} + H_2O$$

$$(\Sigma) \quad H_2A + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow A + H_2O$$

Cette interprétation permet ainsi d'envisager la genèse du furfural par la série de réactions suivantes schématisées dans la figure 5 : à l'attaque protonique au niveau de l'hydroxyle de la structure cétolique (II) de l'acide ascorbique (1) succède l'enchaînement hétérocyclique (III); l'ouverture, par hydrolyse de l'anneau lactonique (IV) conduit, par perte d'une molécule d'eau et après décarboxylation à la formation de furfural (V).

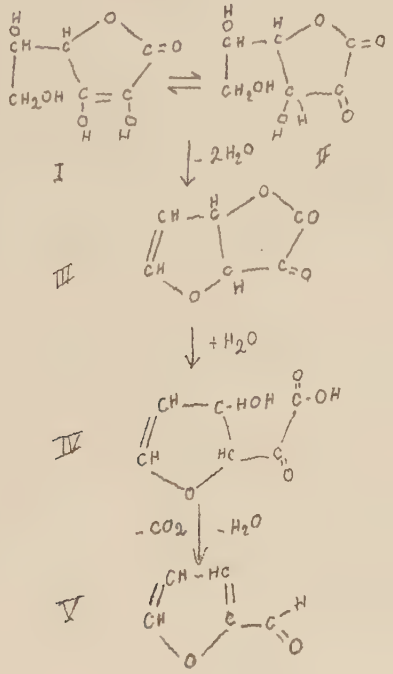


Figure 5

Chapitre II - 2

DEGRADATION OXYDATIVE

Le premier stade accessible de l'oxydation de l'acide ascorbique (dégradation réversible) est parfaitement établi : il conduit à l'acide déhydroascorbique par transfert de deux électrons à un accepteur et libération de deux protons.

Nous avons vu par contre (chapitre I-3) que la dégradation se poursuit (stade irréversible) selon des processus qui sont encore discutés et donnent lieu à des interprétations différentes.

L'objet de nos recherches a été de tenter de préciser ces mécanismes par des études cinétiques et, en caractérisant les produits formés à partir de l'acide déhydroascorbique au cours de sa dégradation en milieu acide ou neutre.

1 - CINETIQUE DE LA DEGRADATION DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE

L'acide déhydroascorbique est préparé par oxydation de l'acide ascorbique par l'iode (70); une fois neutralisé, l'acide iodhydrique formé au cours de la réaction ne gêne pas la poursuite de l'étude. Toutefois, les rendements obtenus par cette méthode sont en moyenne de 70 à 75 %, la lactone étant très sensible aux ions hydroniums. Aussi, avons-nous réalisé l'oxydation en présence d'acétate de sodium qui, sans créer une dismutation de la molécule d'halogène, neutralise l'acide iodhydrique formé suivant l'équation :

$$H_2A + 2I + 2\ CH_3COONa \longrightarrow A + 2\ NaI + 2\ CH_3\ COOH$$

Le rendement est ainsi quantitatif.

L'acide déhydroascorbique est dosé par iodométrie après réduction à pH 3 en acide ascorbique par un courant d'hydrogène sulfuré (30 mn). L'excès d'hydrogène sulfuré est déplacé par un courant d'azote (vérification par le papier à l'acétate de plomb) et la solution, débarassée par filtration du soufre colloïdal formé, est titrée par une solution d'iode 0,1 N.

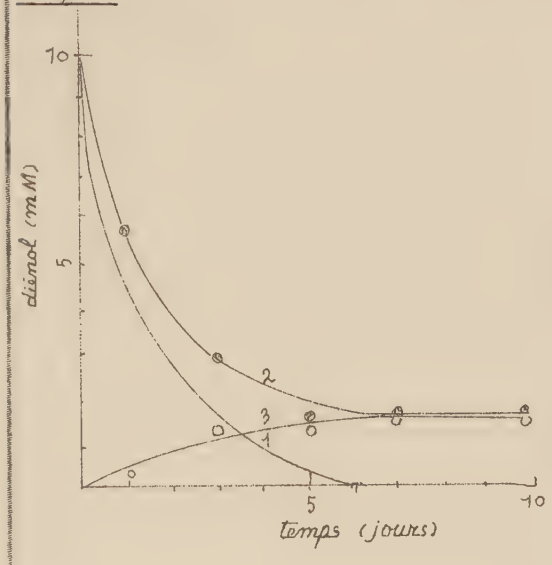
Le pouvoir réducteur qui apparaît dans les solutions dégradées d'acide déhydroascorbique est dosé, également par iodométrie, sur un témoin identique. La quantité d'acide déhydroascorbique correspond ainsi au pouvoir réducteur après passage de l'hydrogène sulfuré diminué de celui que présente directement la solution témoin.

L'étude cinétique a été effectuée sur des solutions d'acide déhydroascorbique à la concentration de 10 mM à 37°C et à l'abri de l'oxygène :

- en présence de 20 mM d'acide acétique (pH initial 3,2)
- en tampon phosphate 0,067 M (pH 7,2)
- en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium (10 mM).

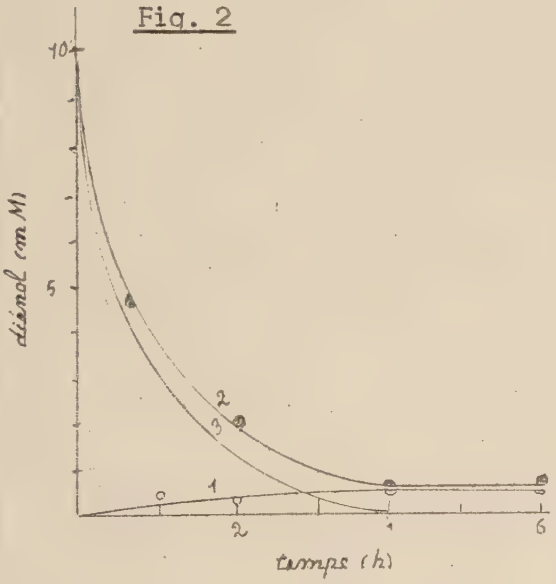
Les résultats sont portés sur les figures 1, 2 et 3.

Fig. 1



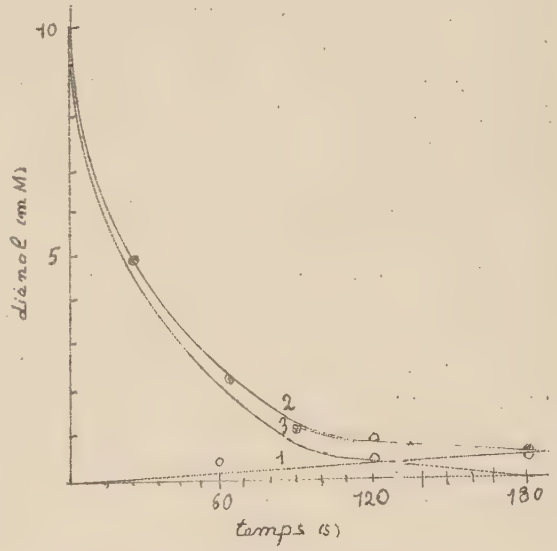
Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique (pH 3,2). 1 : pouvoir réducteur direct de la solution témoin (subst. réductrice spontanée). 2 : pouvoir réducteur après passage d'hydrogène sulfuré (acide ascorbique et subst. réductrice). 3 : pouvoir réducteur correspondant à la réduction de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique (valeur de 2 diminuée de la valeur de 1).

Fig. 2



Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique (pH 7,2). Notations identiques à celles de la fig. 1.

Fig. 3



Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium. Notations identiques à celles de la figure 1.

La cinétique obéit dans tous les cas à l'équation des réactions du premier ordre. En solution acétique, la constante moyenne de vitesse, $k.mn^{-1}$ à 37° C est égale à $5.\ 10^{-4}$ et la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 23 heures; en tampon phosphate 7,2, la constante de vitesse est de $2.\ 10^{-2}$ et la demi-vie de 35 mn. Pour 10 mmoles d'acide déhydroascorbique initial, il se forme à pH 3,2 en 6 jours 1,5 mmole d'une substance réductonique, à pH 7,2 0,5 mmole en 5 heures.

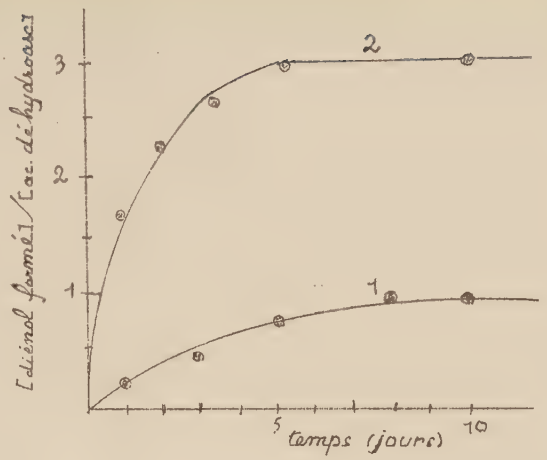
L'évolution de l'acide déhydroascorbique en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium est beaucoup plus rapide (fig. 3). La constante de vitesse $k.mn^{-1}$ à 20°C est voisine de 2 et la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 20 secondes. Il se forme 0,5 mmole de composé réducteur en 180 secondes. Dans le même temps, le pouvoir rotatoire $[\alpha]^{20}_{D}$ passe de + 56° à -25°; il se stabilise à cette valeur (dicétogulonate de sodium) et passe à -18° (acide dicétogulonique) après addition au milieu d'un équivalent d'acide chlorhydrique.

En présence de deux équivalents d'hydroxyde de sodium, la cinétique de la dégradation, trop rapide, ne peut être suivie. Le pouvoir rotatoire passe en moins d'une minute à des valeurs très basses (-43° en 60s). Il se produit alors, à 20°C, un lent remaniement moléculaire avec une remontée du pouvoir rotatoire qui se stabilise en 17 mn à -6° et ne varie plus, même après acidification du milieu. Il apparaît, dans ces conditions, 0,5 mmole de composé réducteur pour 10 mmoles d'acide déhydroascorbique initial, ainsi que 0,5 mmole d'acide oxalique.

II - DIENOLISATION DES PRODUITS DE DEGRADATION EN PRESENCE D'UN ACCEPTEUR D'ELECTRON

Nous avons vu qu'il apparaît spontanément dans les solutions d'acide déhydroascorbique évoluées sous atmosphère inerte une substance réductrice dont le comportement est similaire à celui de l'acide ascorbique. Par mole d'acide déhydroascorbique il se forme en moyenne 0,15 mole de composé réducteur en solution aqueuse à pH 3,2 et 0,05 mole en tampon phosphate 7,2. Cette substance semble résulter d'un équilibre tautomère céto-énolique. En effet, la présence d'un accepteur d'électron (iode) est susceptible de déplacer cet équilibre par oxydation du diénol engendré. Il apparaît, dans ces conditions, une molécule de composé réducteur par molécule d'acide déhydroascorbique à pH 3,2, en tampon phosphate 7,2 trois molécules. La cinétique a été étudiée sur des solutions d'acide déhydroascorbique maintenues à 37°C en présence d'un excès d'iode. L'iode consommé est dosé, par retour, par une solution de thiosulfate de sodium 0,1 N. Les résultats obtenus sont portés sur la fig.4. Il se forme, par molécule d'acide déhydroascorbique, une molécule de composé réducteur à pH 3,2 en 10 jours, trois molécules à pH 7,2 en 6 jours, la première structure diénolique apparaissant dans ce dernier milieu en moins de 8 heures.

Fig. 4



Diénolisation des produits de dégradation de l'acide déhydroascorbique (conc. initiale 10mM). I : à pH 3,2 - II : à pH 7,2.

III - NATURE DES PRODUITS FORMES

- Anhydride carbonique

L'anhydride carbonique présent dans les solutions d'acide déhydroascorbique dégradées a été isolé par entraînement à l'aide d'un courant d'azote dans une solution d'hydroxyde de baryum et dosé volumétriquement par acidimétrie.

En solution aqueuse non tamponnée (pH initial 3,2) il se forme par mole d'acide déhydroascorbique 0,17 mole d'anhydride carbonique, en tampon phosphate 7,2, 0, 05 mole, et après oxydation par deux équivalents d'iode 0,37 mole.

Les cinétiques de l'évolution d'anhydride carbonique et de la disparition concomitante de la structure diénolique de l'acide ascorbique dans les solutions de cet acide dégradées en tubes scellés à 70°C en atmosphère d'oxygène (air) permettent de relier les deux phénomènes comme en témoignent les résultats réunis dans le tableau 1 :

Temps (h)	H_2A (mole)	ΔH_2A (mole)	CO_2 (mole)
0	100	0	0
24	91	9	10
48	88	12	13
72	85	15	15
96	83	17	17
120	79	21	20

Tableau 1

Le rapport moléculaire du dégagement d'anhydride carbonique sur la disparition du diénol est en moyenne égal à 1.

- Oxyde de carbone

L'oxyde de carbone a été détecté dans l'atmosphère surmontant les solutions aqueuses d'acide ascorbique dégradées en tubes scellés et en présence d'oxygène à l'aide du réactif pallado-molybdique sur gel de silice. La recherche quantitative a été effectuée par la technique de microdiffusion de Conway (27).

L'oxyde de carbone a été retrouvé dans les dégagements gazeux accompagnant la dégradation autoxydative de l'acide ascorbique en solution aqueuse, excepté dans le cas où la dégradation est menée en tampon phosphate à pH 7,2. Il n'a pas été possible d'établir une relation stoechiométrique entre la destruction de l'acide ascorbique et l'évolution d'oxyde de carbone.

- Acide formique

Extrait à pH 1 du milieu réactionnel par l'oxyde d'éthyle exempt de peroxydes, l'acide formique a été caractérisé à l'état de formiate de sodium par la technique d'EEGRIWE (45) et dosé par la microméthode de GRANT (61).

Dans les solutions d'acide déhydroascorbique (10 mmoles) maintenues 60 mn à 37° C., il apparaît en tampon phosphate pH 7,2 0,4 mmole d'acide formique si la dégradation s'effectue sous atmosphère inerte et 0,1 mmole en présence d'oxygène. Le rendement est accru (1 mmole) après oxydation par six équivalents d'iode.

Il n'a pas été retrouvé d'acide formique dans les solutions aqueuses d'acide déhydroascorbique non tamponnées (pH initial 3,2).

- acide oxalique

Isolé en milieu acétique à l'état de sel de calcium, l'acide oxalique a été dosé par manganimétrie.

La présence d'acide oxalique n'a été décelée que dans les solutions d'acide déhydroascorbique dégradées à un pH supérieur à 9 ou en tampon phosphate.

La figure 5 représente la cinétique de la formation d'oxalate en tampon phosphate (0,067 M)de pH 7,2 à partir d'une solution d'acide déhydroascorbique (10 mmoles) maintenue à 37°C., sous atmosphère inerte.

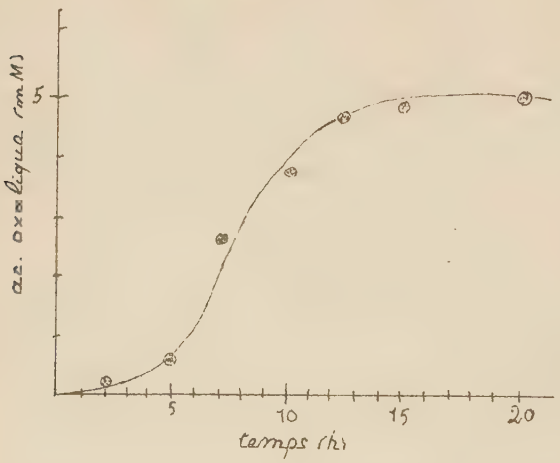


Figure 5 -
Cinétique de la formation d'acide oxalique à partir de l'acide déhydroascorbique (c = 10 mM) évolué en tampon phosphate 7,2.

2) Mécanisme par autoxydation à niveau radicalique

Pour WEISSBERGER et coll. (143) le cuivre divalent serait susceptible d'être chélaté par l'ion monovalent ascorbate, phénomène s'accompagnant d'un transfert d'électron au métal. Le chélate cuivreux, peu stable, se dissocierait, créant une étape radicalique transitoire, de type semi-quinonique, autoxydable par l'oxygène moléculaire. Le radical pérhydroxyle libéré réagirait alors avec l'ion cuivreux, pour former du peroxyde d'hydrogène :

$$(1)\quad HA^{-}\,H^{+} + Cu^{2+} \longrightarrow Cu^{+} + H^{+} + HA.$$

$$(2)\quad HA. + O_2 \longrightarrow A + HO_2$$

$$(3)\quad HO_2. + Cu^{+} \longrightarrow HO_2^{-} + Cu^{2+}$$

$$(4)\quad HO_2^{-} + H^{+} \longrightarrow H_2O_2$$

$$(\Sigma)\quad H_2A + O_2 \longrightarrow A + H_2O_2$$

D'autres faits expérimentaux ont été apportés qui permettent de rattacher les propriétés fortement oxydantes des systèmes acide ascorbique-ion métallique (fer ou cuivre) en présence d'oxygène au radical libre hydroxyle (22, 24, 39) résultant d'une réaction de Fenton entre l'ion métallique à l'état de valence minimale et le peroxyde d'hydrogène engendré dans le système, suivant le mécanisme de Haber-Weiss (66) :

$$H_2O_2 + Me^{n} \longrightarrow Me^{n+1} + HO^{-} + HO.$$

En outre, il a été montré que l'acide ascorbique sensibilise la réaction de Fenton elle-même en agissant comme co-réducteur (10, 24, 38, 78). Ces propriétés de l'acide ascorbique ont permis de réaliser un système modèle (137) composé d'acide ascorbique et d'ion ferreux chélaté par l'acide éthylène diamine tétracétique, susceptible d'hydroxyler, en présence d'oxygène, des substrats aromatiques divers (24, 32, 89, 137) et des stéroïdes (26, 121).

CHAPITRE I - 3

DEGRADATION

A - DEGRADATION REVERSIBLE

L'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique implique un transfert de deux électrons vers le milieu solvant avec libération de deux protons. Or, certains faits expérimentaux observés dans l'oxydation de l'acide ascorbique ne paraissent interprétables que si l'on suppose un processus de transfert en deux étapes à un électron, c'est-à-dire la formation intermédiaire d'un radical HA. entre la structure diénolique de l'acide ascorbique et la structure dicétonique de l'acide déhydroascorbique.

1) Acide L - monodéhydroascorbique

Dès 1936, BEZSSONOFF et WOLOSZYN (11) envisagent, sur des mesures de consommation d'oxygène, la formation, à partir de l'acide ascorbique, d'un intermédiaire hémi-oxydé qu'ils nomment acide monodéhydroascorbique. En 1939, GIROUD et GERO (60), étudiant l'évolution de solutions aqueuses d'acide ascorbique en présence d'ions cuivriques et en atmosphère privée d'oxygène, aboutissent à des conclusions identiques après avoir constaté que le pouvoir réducteur de ces solutions n'était pas le même envers le 2,6-dichlorophénol-indophénol que vis-à-vis du bleu de méthylène. Tout se passait comme si l'oxydation avait fait apparaître un corps réduisant encore l'indophénol, mais qui ne réduirait plus, sous irradiation ultra-violette, le bleu de méthylène. La différence entre ces deux pouvoirs réducteurs s'annule en présence d'oxygène. La cinétique de l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions cuivriques montre que celle-ci s'effectue par réaction d'un ion cuivrique sur une molécule d'acide ascorbique, ce qui correspond au départ d'un seul électron (56). Il s'ensuit nécessairement que l'oxydation entière comporte deux étapes, avec la formation d'un produit intermédiaire semi-oxydé (143).

L'instabilité de ce composé laisse supposer qu'il s'agisse d'un radical libre HA. (13, 39, 56), de configuration semi-quinonique (34; 143). Le composé ne manifestant, en système solvant rigide, aucun pouvoir d'émission de fluorescence, il est probable que la vie moyenne de l'état excité est inférieure à 10^{-12} seconde (39). Ce n'est que dans les solutions concentrées, et lorsque la quantité d'oxygène moléculaire présent dans le milieu est insuffisante à l'oxyder rapidement, que ce radical formerait par dimérisation des composés doubles $(HA)_2$ relativement stables, mais encore autoxydables par l'oxygène moléculaire (56).

Il semble, à l'heure actuelle, que le radical ascorbyle puisse être le substrat d'importantes propriétés biochimiques de l'acide ascorbique, comme le témoignent, depuis 1954, les travaux consacrés aux relations existant entre l'acide monodéhydroascorbique et la diphosphopyridine nucléotide-oxydase (9, 82 - 85, 93, 103).

2) Acide L - déhydroascorbique

L'acide déhydroascorbique, de formule brute théorique $C_6H_6O_6$ (PM = 174,1) résulte de la perte, par l'acide ascorbique, de deux atomes d'hydrogène (fig. 2 : A). C'est une molécule très instable, qui évolue rapidement et irréversiblement, en présence ou en absence d'oxygène. Classiquement, c'est une α - dicétone que l'on peut, à ce titre, isoler à l'état de bis - 2,4 - dinitrophénylhydrazone (F = 280° C) (115). En fait, contrairement aux α - dicétones typiques, cet acide ne présente aucune absorption sélective dans l'ultra-violet ou le visible ($\lambda > 210$ mμ), ce qui implique une dissimulation du groupement chromophore α - dicétonique. Aussi a-t-on proposé, par analogie avec d'autres combinaisons tricarbonyliques vicinales aptes à former spontanément des hydrates de cétone, une structure bis-gem-dihydroxyle (68, 70, 101). Il a été envisagé également l'hypothèse d'une stabilisation intra-moléculaire par hémi-cétalisation (68). EISTERT (46) estime que l'acide déhydroascorbique cristallisé anhydre doit présenter un pont oxygène entre un carbonyle et un hydroxyle de la chaîne glycolique, comme il est admis pour les dicarbonyles osoniques en solution (118) et pour l'acide 2,céto-L-gulonique (51). Selon Von EULER (48), l'insolubilité de l'acide déhydroascorbique anhydre à la température ordinaire, son absence de coloration, son point de fusion élevé (81), ainsi que la possibilité d'obtenir des combinaisons équimoléculaires de l'acide déhydroascorbique avec le méthanol (113) militent en faveur d'une dissimulation de la dicétolactone par des liaisons hémi-cétaliques intra ou inter-moléculaires. Enfin, ALBERS et MULLER (1) ont montré, dans un travail récent, que le poids moléculaire de l'acide déhydroascorbique, déterminé soit cryoscopiquement, soit ébullioscopiquement à partir de différents esters, est le double de la valeur calculée, ce qui leur fait proposer une structure dimère lactolide de type dioxane.

L'acide déhydroascorbique se prépare habituellement par oxydation de l'acide ascorbique par le brome ou l'iode (70) conformément à l'équation :

$$H_2A + 2\,I \longrightarrow A + 2\,HI$$

Pour l'obtention de solutions aqueuses d'acide déhydroascorbique exemptes d'électrolytes, le procédé suivant peut être utilisé (101, 112) : dissoudre l'acide ascorbique (1,08 g) dans l'eau (10 ml) et agiter pendant 15 mn avec un volume égal d'une solution éthérée de quinone récemment sublimée (0,66 g). L'éther est décanté, et la solution aqueuse est lavée cinq fois avec un égal volume d'éther éthylique.

Il existe deux méthodes permettant d'accéder à l'acide déhydroascorbique cristallisé et anhydre. Le procédé de KENYON et MUNRO (81) consiste à oxyder par l'iode l'acide ascorbique en solution méthanolique. L'acide iodhydrique formé est éliminé du milieu par du carbonate de plomb. Après filtration, les traces de plomb en solution sont précipitées par l'hydrogène sulfuré.(≠). La cristallisation est faite dans l'éthanol anhydre. On obtient, par cette méthode, une poudre microcristalline d'acide déhydroascorbique anhydre, présentant un point de fusion de 220 - 225° avec décomposition.

(≠) Les auteurs ne font pas état d'une réduction possible par l'hydrogène sulfuré de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique.

La seconde méthode est celle de PECHERER (113) : l'acide ascorbique en présence de carbonate de plomb, dans du méthanol, est traité à -10°C par une quantité équimoléculaire de chlore. Le filtrat est soumis à l'hydrogène sulfuré, filtré et concentré sous vide à 40°. Le sirop obtenu est dissous dans la méthyl-isobutyl-cétone; après cristallisation à 4° pendant 72 heures, on obtient un complexe équimoléculaire d'acide déhydroascorbique et de méthanol ($C_7H_{10}O_7$) soluble dans l'eau, à point de fusion de 102-5°, au pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{27}$ de + 62° dans le méthanol. Ce complexe, en solution dans l'alcool isopropylique, se décompose par chauffage à 65-80°, en donnant de l'acide déhydroascorbique anhydre (F = 220 - 5°).

L'acide déhydroascorbique anhydre se présente sous la forme de micro-cristaux incolores, insolubles dans les solvants organiques, très peu solubles dans l'eau à température ordinaire, solubles dans l'eau à la température de 60° par hydratation (81).

L'acide déhydroascorbique hydraté est un produit sirupeux, soluble dans les solvants polaires (81). Il présente une réaction pratiquement neutre si l'on extrapôle la valeur de son pH au temps zéro (123), précaution nécessaire car, nous le verrons par la suite, il se dégrade très rapidement en substances protolysables. Son pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$ est de + 56°. Il se laisse réduire quantitativement, à pH 5, par l'hydrogène sulfuré, en régénérant l'acide ascorbique qui peut être à nouveau titré par les réactifs réducimétriques habituels. Il est réduit de même par le glutathion, en présence de glutathion - déshydrogénase (30). Il possède enfin, sur le plan biologique, une activité antiscorbutique similaire à celle de la forme réduite (68, 101).

B - DEGRADATION IRREVERSIBLE

La première étape de la dégradation de l'acide déhydroascorbique (fig. 2 : A) résulterait, selon HERBERT et coll. (70) de la rupture hydrolytique de son noyau lactonique (délactonisation) avec formation de l'acide 2,3 - dicéto - L - gulonique (fig. 2 : B). Il apparaît en effet rapidement dans les solutions aqueuses d'acide déhydroascorbique, initialement neutres, des ions hydroniums; ROSENFELD (123) signale que des solutions d'acide déhydroascorbique ($6,8 \cdot 10^{-2}$ M) qui ont au temps zéro par extrapolation, un pH de 6,40, présentent, au bout de 45 mn un pH de 3,33. Si les solutions d'acide déhydroascorbique fraîchement préparées peuvent être réduites quantitativement en acide ascorbique par l'hydrogène sulfuré, il ne peut être récupéré après évolution de quelques heures qu'une faible partie de l'acide déhydroascorbique initial (70); la substance formée ne peut être convertie en acide ascorbique qu'après cristallisation en présence d'acide iodhydrique (rendement de 75 % environ), ce qui démontre une intégrité de la chaîne originale à 6 atomes de carbone (évolution non - desmolytique). Les solutions d'acide déhydroascorbique qui n'absorbent ni dans l'ultra-violet ni dans le visible laissent apparaître après quelques heures d'évolution, un groupement chromophore dont la longueur d'onde d'absorption maximale est comprise entre 290 et 295 mμ (70, 124). Enfin, les solutions subissent une modification du pouvoir rotatoire qui passe, en 60 heures, de + 56° à - 6°, avec stabilisation à la valeur dernière (70).

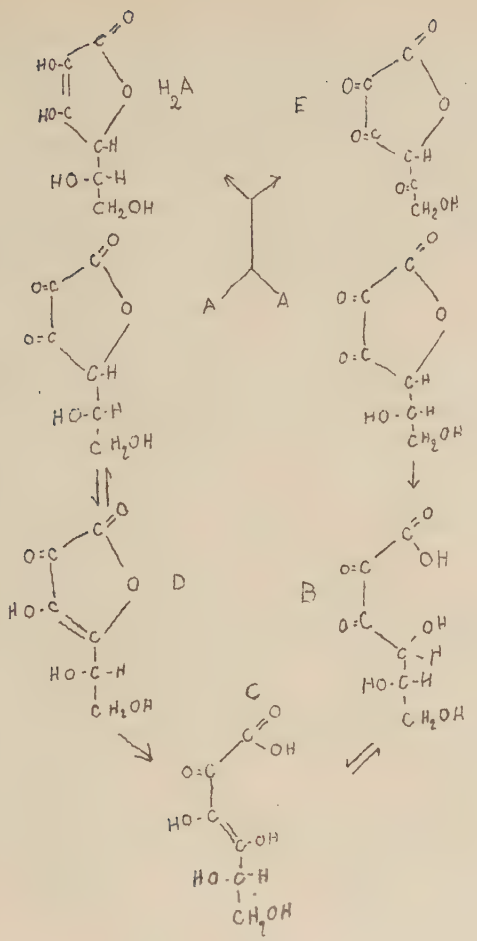


Figure 2

A cette conception de délactonisation directe s'oppose celle de GHOSH et RAKSHIT (58) selon laquelle l'acide déhydroascorbique subirait une céto-énolisation préalable au niveau du carbone 3 (fig. 2 : D). Par addition d'un équivalent d'hydroxyde de sodium à une solution d'acide déhydroascorbique, ces auteurs constatent qu'il se forme un sel monosodique qui présente un pouvoir rotatoire de - 26°; après addition à la solution saline, d'un équivalent d'acide chlorhydrique, le pouvoir rotatoire prend une valeur de -10°, différente donc du pouvoir rotatoire initial de l'acide déhydroascorbique (+ 56°). D'après ces auteurs, cette forme énolique pourrait être réduite à peu près quantitativement (95 %) en acide ascorbique, ce qui indiquerait l'intégrité à ce stade de la fonction lactone. La lactone ne pourrait être ouverte que par addition d'un second équivalent d'hydroxyde de sodium, ce qui permettrait d'expliquer l'obtention de sels alcalins ou alcalino-terreux du type $C_6H_6O_7M$ (M = Na_2, Ca ou Ba) (81). Sur les valeurs des pK données par GHOSH et RAKSHIT, l'anion monovalent énolate à anneau lactonique fermé apparaîtrait à pH 7,3, l'anion divalent à anneau lactonique ouvert à pH 8,5 (123). Toutefois, selon PENNEY et ZILVA (115), la délactonisation s'effectuerait quantitativement, et ce en moins d'une heure à température ordinaire, à pH 7,4, en tampon borate 0,1 N.

Il apparaît dans les solutions aqueuses d'acide déhydroascorbique, spontanément ou après alcalinisation, une substance à structure diénolique, de type aci-réductone (33, 110). Ainsi, en présence de deux équivalents d'hydroxyde de sodium, l'acide déhydroascorbique est susceptible de céder deux électrons à des accepteurs tels que l'iode, le 2,6 - dichlorophénol - indophénol, les ions argent (49, 58, 76). L'évolution spontanée d'acide déhydroascorbique, même en solution acide, révèle l'apparition en quelques heures d'un certain pouvoir réducteur (19, 116, 123). Les études spectrophotométriques de la dégradation des acides ascorbique ou déhydroascorbique conduisent à des constatations identiques. Ainsi, la bande d'absorption du groupement diénolique de l'acide ascorbique (244 mμ) diminue progressivement en présence de peroxyde d'hydrogène; au bout de 90 heures, une inflexion apparaît à 294 mμ ; l'état final est atteint en 17 jours avec deux bandes aux maximums 244 (ε = 135) et 297 m (ε = 380) (124). De même, en solution alcaline, l'acide déhydroascorbique présente deux bandes d'absorption maximale à 255 et 340 mμ, qui subissent par acidification, un déplacement hypsochrome à 245 et 295 mμ ; le coefficient d'extinction de la bande 245 mμ correspond à l'absorption d'une solution qui contiendrait 5 % d'acide ascorbique (48).

La formation de cette substance diénolique a été interprétée différemment suivant les auteurs: GHOSH et RAKSHIT (58) envisagent que le diénol résulterait de la délactonisation de la structure énolique de l'acide déhydro ascorbique (fig. 2 : D→C), PERROT (116) de l'énolisation de l'acide dicétogulonique (fig. 2 : B → C), et ROSENFELD (123) d'une réaction de dismutation entre deux molécules d'acide déhydroascorbique qui pourrait conduire à la régénération d'acide ascorbique et à la formation d'un acide 2,3,5 - tricétogulonique lactonisé (fig. 2 : 2 A→ H_2A + E). Quelque soit le processus initial, la dégradation de l'acide déhydroascorbique se poursuit par une oxydation plus poussée de la molécule et une rupture du squelette carboné.

La mise en évidence d'anhydride carbonique au cours de l'autoxydation de l'acide ascorbique (20, 48, 90, 102, 104, 116) a permis d'émettre l'hypothèse de la formation de L - xylosone (19, 102, 104) par décarboxylation de l'acide dicétogulonique selon le schéma :

$CH_2OH - CHOH - CHOH - CO - CO - COOH \rightarrow CH_2OH - CHOH - CHOH - CO - CHO + CO_2$

L'oxydation des éthers méthyliques de l'acide ascorbique par le permanganate (70) ou par l'ozone (99) conduit aux dérivés correspondants des acides oxalique et thréonique. On pouvait penser obtenir aussi ces acides au cours de l'autoxydation de l'acide ascorbique en solution aqueuse; en fait l'acide oxalique n'a pu être décelé que dans les solutions d'acide ascorbique dégradé à des pH supérieurs à 9 (123, 125) ou évolué en tampon phosphate à pH 7 (123).

On voit que les processus de la dégradation de l'acide déhydroascorbique sont encore très discutés, et l'instabilité de cet acide, interprétée différemment selon les auteurs, rend compte des difficultés rencontrées dans l'étude de ces mécanismes.

CHAPITRE I - 4

STABILISATION

Il est bien connu que la dégradation de l'acide ascorbique en solution aqueuse se traduit à la fois par une inactivation partielle ou totale de la vitamine, un jaunissement plus ou moins marqué des solutions et par une production d'anhydride carbonique qui peut être à l'origine de certaines incompatibilités, en particulier si l'acide ascorbique est associé à des ions métalliques.

Parmi les différents agents susceptibles de déclencher ou d'accélérer ce processus, nous avons vu (I - 2) qu'on peut distinguer essentiellement : un facteur chimique, l'oxygène moléculaire dissous; un facteur catalytique représenté par des traces d'ions métalliques parmi lesquels le cuivre a été reconnu comme le plus actif; un facteur ionique correspondant au pH de la solution; un facteur thermique; un facteur photochimique.

L'influence des trois premiers facteurs a retenu plus particulièrement l'attention des laboratoires désireux de conditionner l'acide ascorbique en ampoules. Après avoir constaté que la présence d'une atmosphère inerte n'entravait pas totalement la dégradation de la vitamine (72), il a été proposé différents procédés souvent contradictoires. Ainsi, après avoir établi que la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique était inversement proportionnelle au carré de la concentration en ion hydrogène (34), il semblait logique de conditionner la vitamine C sous sa forme acide, solution adoptée par la majeure partie des laboratoires. Toutefois, certains auteurs ont préconisé l'utilisation de l'ascorbate de sodium, invoquant la plus grande stabilité de l'acide ascorbique sous sa forme salifiée que sous sa forme acide (7, 79, 98, 139).

Parallèlement aux études portant sur des modifications intrinsèques (atmosphère inerte, pH), des recherches ont été poursuivies pour savoir si par addition de substances variées, dites "antioxydantes", la dégradation oxydative de l'acide ascorbique pouvait être retardée. A l'heure actuelle, on peut distinguer, sur le plan chimique, six groupes de protecteurs :les halogénures alcalins, les acides minéraux ou organiques, les acides aminés, les polyols, les sucres et les dérivés soufrés minéraux ou organiques.Nous avons réuni dans le tableau 1 les substances antioxydantes qui ont été proposées comme agents efficaces de la stabilisation de l'acide ascorbique.

Le mécanisme généralement admis pour ces antioxydants est rattaché à leur pouvoir séquestrant vis à vis de l'élément catalytique (ions cuivreux ou cuivriques), mécanisme qui semble évident pour les acides minéraux et organiques, les acides aminés naturels et les sels de l'acide éthylène diamine tétracétique. Par contre, le rôle des halogénures, des sucres et des polyols n'est pas précisé; BANDELIN et TUSCHHOFF (4) estiment que les sucres et les polyols pourraient abaisser la solubilité de l'oxygène moléculaire. Enfin, deux théories s'affrontent au sujet des dérivés soufrés. Pour GERO (54, 55), la formation d'un complexe entre l'ion cuivreux et le groupement soufré est le facteur essentiel, l'ion cuivreux résultant soit de la réduction du cuivre divalent par la substance soufrée (cystéine, thiourée, glutathion), soit de la réduction par l'acide ascorbique quand le dérivé soufré se révèle incapable par lui-même de réduire l'ion cuivrique (thiamine). D'après GHOSH et RAKSHITT (57),les composés sulfurés interviendraient, compétitivement à l'acide ascorbique, en réagissant en priorité avec les molécules d'oxygène activées.

TABLEAU 1

Substances antioxydantes proposées pour la stabilisation de l'acide ascorbique

Nature chimique	Dénomination	Références bibliographiques
1) Halogénures	chlorures, bromures, iodures alcalins	2, 91, 95, 142
2) Acides		
a) minéraux	acide métaphosphorique	17, 67, 71
	acide phosphorique	67
	acide borique	100
b) organiques	acide citrique	37, 122
	acide tartrique	37, 122
	acide oxalique	17, 63, 119
3) Acides aminés	glycocolle, alanine, etc	120
	EDTA Na_2	47, 73
	EDTA Na_2 Ca	35
4) Polyols	Glycérol, propylène glycol	4, 7, 35
	sorbitol	4
5) Sucres	Fructose, maltose, glucose	75
	saccharose	75, 122
6) dérivés soufrés		
a) minéraux	sulfite	37, 128, 135
	hydrosulfite	135
	thiosulfate	88
b) organiques	cystéine	35
	thiourée	17, 55, 129, 135
	phénylthiourée	132
	glutathion	17, 55, 135
	thiamine	54
	thioglycol	139
	thiocarbamide	37
	acide thioglycolique	131, 134
	acide thiolactique	57, 134
	diéthyldithiocarbamate	17, 129

T R A V A I L

P E R S O N N E L

CHAPITRE II - 1

DEGRADATION NON - OXYDATIVE

Si de nombreux travaux ont trait à la dégradation autoxydative de l'acide ascorbique, cette vitamine se décompose, en solution aqueuse et sous atmosphère privée d'oxygène, selon un processus qui n'a fait jusqu'ici l'objet d'aucune étude particulière, du moins à notre connaissance. C'est ce qui a motivé nos recherches sur la nature des produits formés au cours de cette destruction et les facteurs susceptibles de l'influencer.

1. CINETIQUE DE LA DEGRADATION THERMOLYTIQUE

- Mode opératoire :

Des solutions aqueuses d'acide ascorbique à la concentration de 10^{-1} (solutions non tamponnées; pH initial de 2,66) sont maintenues en tubes scellés sous atmosphère d'azote et placées dans une étuve "monocellule" préalablement réglée aux températures de 90 et 100°C. La dégradation de l'acide ascorbique en fonction du temps est suivie par iodométrie (1 ml d'iode 0,1 N correspond à $0,5 \cdot 10^{-4}$ mole d'acide ascorbique).

- détermination de l'ordre de la réaction :

Soient (a) la concentration initiale en acide ascorbique et (a - x) la concentration au temps t. Le choix de l'équation représentant la marche de la réaction est déterminé par l'étude de la variation en fonction du temps des valeurs expérimentales de a - x, $\log_{10}\frac{a}{a-x}$ et $\frac{1}{a-x}$. En portant les temps en abscisses, et en ordonnées les valeurs de $\log_{10}\frac{a}{a-x}$ (fig. 1), nous avons obtenu pour chaque température (90 et 100°C) une droite passant par l'origine, traduisant une réaction du premier ordre.

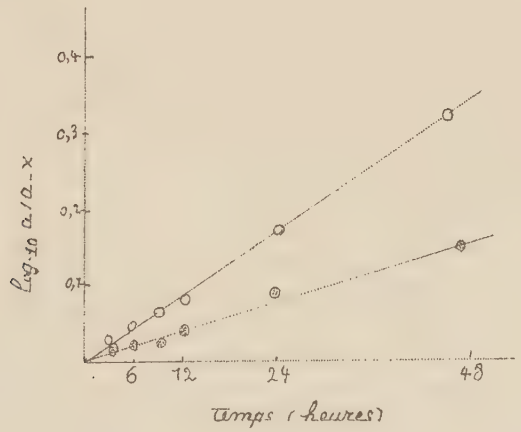


Figure 1 - Allure générale de la réaction aux températures de 90° (●) et 100° (○).

Il faut cependant noter que les points correspondant à des taux de conversion faibles (temps inférieurs à 6 heures) sont légèrement aberrants en raison d'un phénomène concomitant d'autoxydation dû à des traces inévitables d'oxygène.

La résolution de l'équation différentielle $\frac{dx}{dt} = k\ (a-x)^n$ pour n = 1, aboutit par intégration à la relation $\log_e \frac{a}{a-x} = k\ t$, permettant de calculer la constante de vitesse pour chacune des températures (tableau 1)

Tableau 1

Valeurs des constantes de vitesse de la thermolyse de l'acide ascorbique à 90° et 100°C.

temps (h)	10^4 . k . h^{-1} (90°C)	10^4 . k . h^{-1} (100°C)
1	143,9	207,4
2	104,0	183,1
3	104,4	183,8
5	86,7	175,9
6	85,4	169,0
8	78,1	156,2
12	80,3	157,4
24	78,8	157,2
48	79,7	159,2

La valeur élevée de la constante pour les temps inférieurs à 6 heures révèle comme il a déjà été dit l'interférence d'un processus autoxydatif et nous n'avons tenu compte que des valeurs établies pour des temps de réaction supérieurs à 6 heures. Les constantes moyennes de vitesse ($k\ .h^{-1}$) sont ainsi de 79 . 10^{-4} à 90° C et de 157 . 10^{-4} à 100° C.

- Coefficient thermique et durée de demi-réaction :

Le coefficient thermique Q_{10}, facteur d'accroissement de k quand on passe d'une température t à t + 10° C, a été calculé, dans cette réaction pour l'intervalle de température 90 - 100°C. Il est égal à 1,98.

La durée de demi-réaction, temps au bout duquel la moitié des molécules a réagi, établie en appliquant la relation $k = \log_e 2$, est de 44 heures à 100° C. Si l'on admet le principe de la constance de Q_{10} dans les différents intervalles de température, et en faisant Q_{10} égal à 2, la demi-vie de l'acide ascorbique, résultant d'un processus spontané de dégradation par voie non-oxydative, serait donc de dix huit mois environ à 20°C.

II - NATURE DES PRODUITS FORMES

La recherche systématique des différentes substances susceptibles de se former lors de la thermolyse de l'acide ascorbique nous a conduit à mettre en évidence la présence de bioxyde de carbone, de 2 - furaldéhyde et de L - xylose.

L'anhydride carbonique a été décelé par la technique classique à l'hydroxyde de baryum.

La recherche du furfural par formation d'imine ne peut être effectuée en présence d'acide ascorbique. Il est nécessaire de séparer au préalable le furaldéhyde par extraction à l'aide d'un solvant (benzène); sa recherche est pratiquée dans la phase organique par la coloration violette spécifique que développe le furfural en présence du réactif à la benzidine.

En présence de furfural et d'acide ascorbique, le xylose ne peut évidemment être recherché par la réaction basée sur la transformation des pentoses, à chaud et à pH acide, en furfural. Aussi le xylose a t-il été caractérisé à l'état de bis - 2,4 - dinitrophényl-hydrazone (osazone), obtenue en faisant réagir au bain-marie bouillant une solution aqueuse d'acide ascorbique thermolysé avec une solution de 2,4 - dinitrophényl-hydrazine (DNPH) à 2 % dans l'acide sulfurique 9 N.

Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau distillée, traité à 70°C par une solution aqueuse de carbonate acide de sodium qui élimine par solubilisation les DNP hydrazones des céto-acides (acides ascorbique, déhydroascorbique, dicéto-gulonique). L'insoluble est filtré, lavé à l'eau chlorhydrique et à l'eau distillée et repris, après dessication, par du chloroforme qui solubilise sélectivement la DNP hydrazone du furfural. La fraction insoluble est recristallisée deux fois dans l'éthanol-acétone (1/1 en vol.).

La DNP hydrazone isolée présente une bande d'absorption dans le visible avec un maximum à 400 mμ dans le méthanol anhydre. Par "spot-test" à l'hydroxyde de sodium, une coloration bleue intense se développe (avec les céto-acides, cette coloration est rouge). Le spectre et la coloration à l'hydroxyde de sodium sont caractéristiques des α-bis - DNP hydrazones.

Le point de fusion, de 134°5 C, correspond à celui de la bis -DNP hydrazone du L - xylose. L'analyse centésimale du produit a donné les résultats suivants :

Analyse $C_{17}H_{16}O_{11}N_8$:				
Calc. % :	C 40,15	H 3,15	O 34,65	N 22,05
Tr. :	43,38	3,73	34,46	18,43

III - INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA FORMATION DU FURALDEHYDE

Nous avons suivi l'apparition du furfural en fonction des facteurs temps, température et pH. La technique de dosage du furfural que nous avons utilisée est adoptée de celle de Mc CANCE (18).

- Mode opératoire :

Extraire le furfural de la prise d'essai (5 ml) par agitation (4 mn) avec du benzène (5 ml). Centrifuger. Prélever à la pipette 2 ml de la solution benzénique, les introduire dans un tube à essai parfaitement sec et ajouter 5 ml de réactif à la benzidine (benzidine 0,5 g, éthanol anhydre 50 ml, acide acétique pur 50 ml).

Lire la densité optique au spectrophotomètre, 24 mn après l'addition du réactif, à 542 mμ, et comparer à une courbe étalon établie selon un mode opératoire identique.

- Influence du temps de dégradation :

La thermolyse est poursuivie à 100° C pendant 48 heures. La concentration de l'acide ascorbique au temps 0 est de 10^{-1}, avec un pH initial de 2,66. Les résultats de l'étude comparative de l'apparition du furfural et de la destruction de l'acide ascorbique sont donnés au tableau II.

TABLEAU II

Formation de furfural (F) au cours de la thermolyse de l'acide ascorbique (H_2A) suivie en fonction du temps, à 100° C, pour une concentration initiale en H_2A de 100 mM.

temps (h)	H_2A détruit (mM)	F apparu (mM) -	Rapport moléculaire (H_2A détruit)/(F apparu)
1	2,10	0,033	63,63
2	3,60	0,117	30,76
3	5,37	0,429	12,51
5	8,43	1,660	5,07
6	9,65	1,812	5,32
8	11,77	3,200	3,67
12	17,23	4,580	3,76
24	31,46	10,000	3,14
48	53,49	17,140	3,12

- Influence de la température :

L'action de la température est déterminée dans des conditions identiques de concentration au bout de 24 heures. Conformément à la loi d'Arrhénius, la vitesse de formation du furfural est une fonction exponentielle de la température (fig. 2). Il se forme des quantités appréciables de furfural dès la température de 60°C.

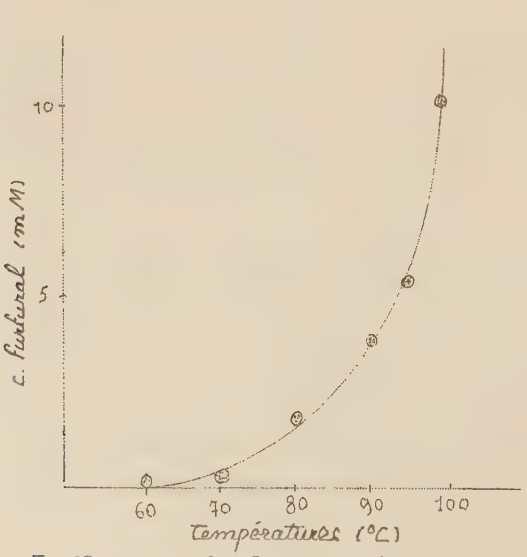


Figure 2 - Influence de la température sur la formation du furfural

- Influence du pH :

La formation de furfural en fonction du pH a été étudiée pendant 24 heures à la température de 100°C (fig. 3). Le taux de furfural décroît rapidement avec le pH. Aux pH supérieurs à 5 le furfural n'apparaît qu'à l'état de traces et il n'est plus possible de le déceler dans les solutions d'ascorbate de sodium de concentration 10^{-1} (pH initial de 5,44) dégradées dans les mêmes conditions de temps et de température.

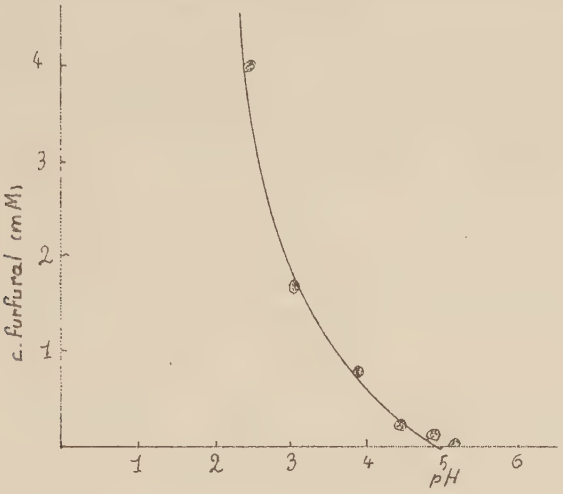


Figure 3 - Influence du pH sur la formation du furfural

IV - INTERPRETATION DES RESULTATS

JENSEN (74), dans des conditions très particulières de pH (1,1) a établi que la décomposition de l'acide ascorbique est monomoléculaire, avec un coefficient thermique de 2,5 et une demi-vie de 10 heures 30 mn à 100°C.

Dans nos conditions expérimentales, pour une concentration de 10^{-1} en acide ascorbique et un pH initial de 2,66, la dégradation thermolytique de l'acide ascorbique correspond aussi à une réaction du premier ordre, mais avec un coefficient thermique de 1,98 et une demi-vie de 44 heures à 100°C.

La formation de furfural par chauffage des solutions aqueuses d'acide ascorbique en milieu acide a été mise en évidence par COX et coll. (29) dès 1932. Plus récemment, SHNAIDMAN (127) a montré que l'on pouvait obtenir du furfural à partir des solutions d'acide ascorbique dans une gamme assez large de pH (0,5 à 7). Cependant nos résultats (fig. 3) révèlent qu'au dessus du pH 5 la cyclisation hétérogène est inappréciable. Nous avons par ailleurs vérifié expérimentalement que l'acide déhydroascorbique ne conduit pas à la formation de furaldéhyde. Ce fait implique que la forme réduite (diénolique) de l'acide ascorbique est nécessaire à la cyclisation furanique.

Le L - xylose formé au cours de la thermolyse pouvait être considéré comme le précurseur du furfural; il faudrait admettre que la délactonisation de l'acide ascorbique en acide 2 - céto - gulonique conduirait par décarboxylation au L - xylose susceptible d'engendrer à son tour le furaldéhyde. Ce schéma réactionnel, s'il n'est pas exclu, ne doit cependant correspondre qu'à un processus secondaire : une solution de L - xylose,

de concentration 10^{-1}, soumise à une dégradation thermolytique à pH 2,66 et à 100° C ne conduit à une formation de traces de furfural qu'après une durée de 6 heures (*).

Par contre le rôle du pH et en particulier celui du point équivalent semble impliquer la participation nécessaire, lors de la cyclisation furanique, du couple tautomère cétol - diénolique, c'est à dire la création préalablement à l'ouverture de la lactone, de l'édifice hétérocyclique.

Si l'on se réfère aux courbes de neutralisation de l'acide ascorbique (14, 86), aux pH inférieurs à 5 coexistent les formes indissociées (H_2A) et protolysées (HA^-), la concentration de la structure non ionisée étant d'autant plus grande que le pH est plus bas. Aux pH supérieurs à 5 nous ne sommes en présence au contraire que de la forme ionique (HA^-).

Ainsi aux pH supérieurs à 5, le seul effet possible sera le départ électrofuge du proton (fig.4.II), par attaque nucléophile de l'ion hydroxyle. Par contre aux pH inférieurs à 5, les protons,

1°) permettront par migration prototropique la transposition du diénol (I) en cétol (III) et

2°) en se fixant sur le doublet libre de l'hydroxyle cétolique (IV) faciliteront le départ nucléofuge de cet hydroxyle avec formation transitoire d'un carbocation (V), apte alors à réagir, par attaque électrophile, avec l'hydroxyle alcoolique primaire du groupement terminal, cette dernière réaction engendrant la chaîne hétérocyclique.

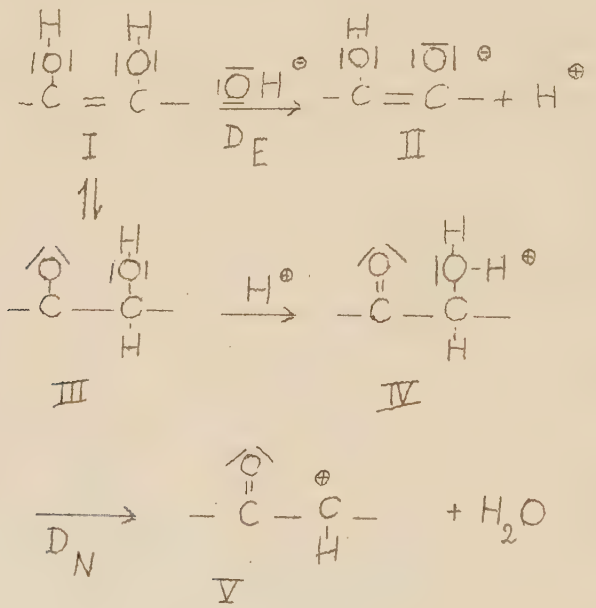


Figure 4

(*) Il a été trouvé dans ces conditions expérimentales les quantités suivantes de furfural : 6 h.: 0,034 mM; 12 h. : 0,101 mM; 24 h. : 0,732 mM; 48 h. : 1,847 mM. Le L - xylose ne peut donc être que très partiellement le précurseur du furfural présent dans les solutions d'acide ascorbique thermolysé.

Cette interprétation permet ainsi d'envisager la genèse du furfural par la série de réactions suivantes schématisées dans la figure 5 : à l'attaque protonique au niveau de l'hydroxyle de la structure cétolique (II) de l'acide ascorbique (1) succède l'enchaînement hétérocyclique (III); l'ouverture, par hydrolyse de l'anneau lactonique (IV) conduit, par perte d'une molécule d'eau et après décarboxylation à la formation de furfural (V).

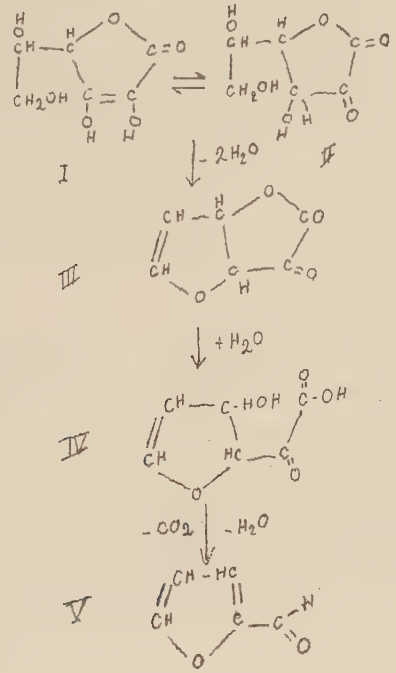


Figure 5

Chapitre II - 2

DEGRADATION OXYDATIVE

Le premier stade accessible de l'oxydation de l'acide ascorbique (dégradation réversible) est parfaitement établi : il conduit à l'acide déhydroascorbique par transfert de deux électrons à un accepteur et libération de deux protons.

Nous avons vu par contre (chapitre I-3) que la dégradation se poursuit (stade irréversible) selon des processus qui sont encore discutés et donnent lieu à des interprétations différentes.

L'objet de nos recherches a été de tenter de préciser ces mécanismes par des études cinétiques et, en caractérisant les produits formés à partir de l'acide déhydroascorbique au cours de sa dégradation en milieu acide ou neutre.

1 - CINETIQUE DE LA DEGRADATION DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE

L'acide déhydroascorbique est préparé par oxydation de l'acide ascorbique par l'iode (70); une fois neutralisé, l'acide iodhydrique formé au cours de la réaction ne gêne pas la poursuite de l'étude. Toutefois, les rendements obtenus par cette méthode sont en moyenne de 70 à 75 %, la lactone étant très sensible aux ions hydroniums. Aussi, avons-nous réalisé l'oxydation en présence d'acétate de sodium qui, sans créer une dismutation de la molécule d'halogène, neutralise l'acide iodhydrique formé suivant l'équation :

$$H_2A + 2I + 2\ CH_3COONa \longrightarrow A + 2\ NaI + 2\ CH_3\ COOH$$

Le rendement est ainsi quantitatif.

L'acide déhydroascorbique est dosé par iodométrie après réduction à pH 3 en acide ascorbique par un courant d'hydrogène sulfuré (30 mn). L'excès d'hydrogène sulfuré est déplacé par un courant d'azote (vérification par le papier à l'acétate de plomb) et la solution, débarassée par filtration du soufre colloïdal formé, est titrée par une solution d'iode 0,1 N.

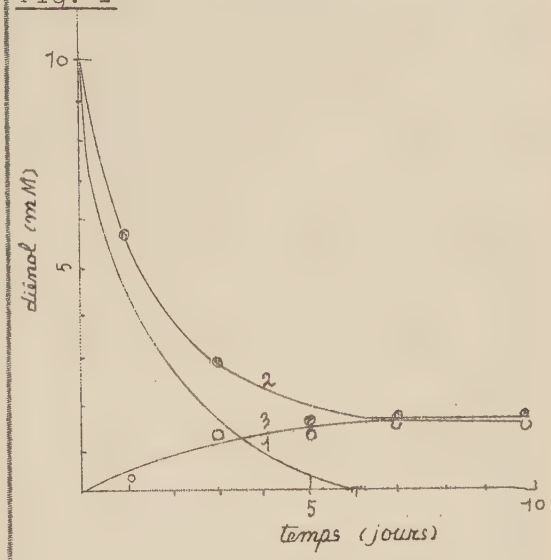
Le pouvoir réducteur qui apparaît dans les solutions dégradées d'acide déhydroascorbique est dosé, également par iodométrie, sur un témoin identique. La quantité d'acide déhydroascorbique correspond ainsi au pouvoir réducteur après passage de l'hydrogène sulfuré diminué de celui que présente directement la solution témoin.

L'étude cinétique a été effectuée sur des solutions d'acide déhydroascorbique à la concentration de 10 mM à 37°C et à l'abri de l'oxygène :

- en présence de 20 mM d'acide acétique (pH initial 3,2)
- en tampon phosphate 0,067 M (pH 7,2)
- en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium (10 mM).

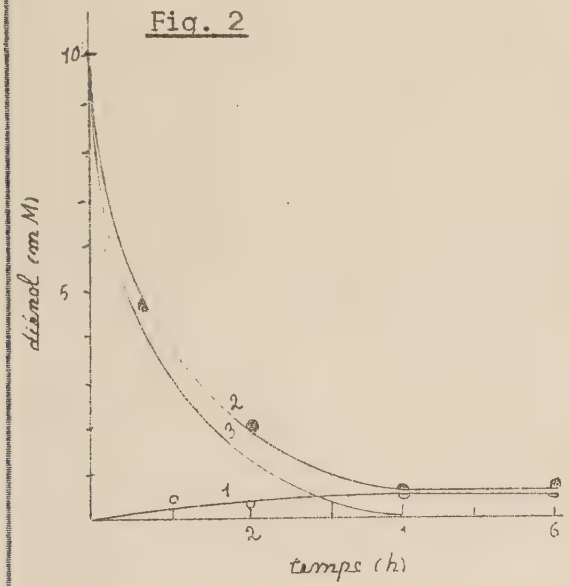
Les résultats sont portés sur les figures 1, 2 et 3.

Fig. 1



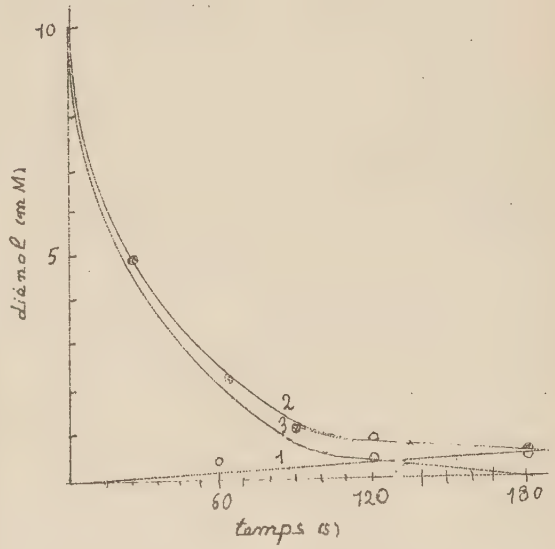
Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique (pH 3,2). 1 : pouvoir réducteur direct de la solution témoin (subst. réductrice spontanée). 2 : pouvoir réducteur après passage d'hydrogène sulfuré (acide ascorbique et subst. réductrice). 3 : pouvoir réducteur correspondant à la réduction de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique (valeur de 2 diminuée de la valeur de 1).

Fig. 2



Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique (pH 7,2). Notations identiques à celles de la fig. 1.

Fig. 3



Cinétique de la dégradation de l'acide déhydroascorbique en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium. Notations identiques à celles de la figure 1.

La cinétique obéit dans tous les cas à l'équation des réactions du premier ordre. En solution acétique, la constante moyenne de vitesse, $k.mn^{-1}$ à 37° C est égale à $5.\ 10^{-4}$ et la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 23 heures; en tampon phosphate 7,2, la constante de vitesse est de $2.\ 10^{-2}$ et la demi-vie de 35 mn. Pour 10 mmoles d'acide déhydroascorbique initial, il se forme à pH 3,2 en 6 jours 1,5 mmole d'une substance réductonique, à pH 7,2 0,5 mmole en 5 heures.

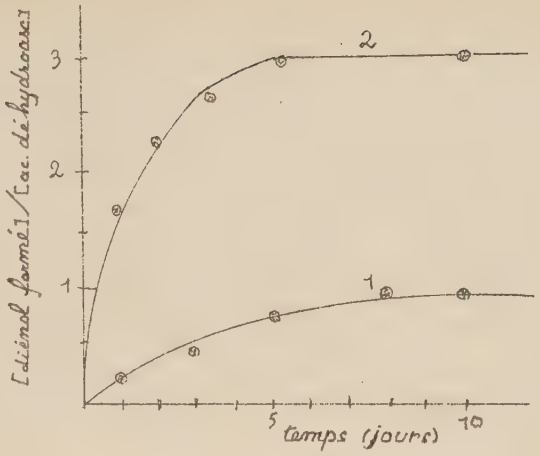
L'évolution de l'acide déhydroascorbique en présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium est beaucoup plus rapide (fig. 3). La constante de vitesse $k.mn^{-1}$ à 20°C est voisine de 2 et la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 20 secondes. Il se forme 0,5 mmole de composé réducteur en 180 secondes. Dans le même temps, le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$ passe de + 56° à -25°; il se stabilise à cette valeur (dicétogulonate de sodium) et passe à -18° (acide dicétogulonique) après addition au milieu d'un équivalent d'acide chlorhydrique.

En présence de deux équivalents d'hydroxyde de sodium, la cinétique de la dégradation, trop rapide, ne peut être suivie. Le pouvoir rotatoire passe en moins d'une minute à des valeurs très basses (-43° en 60s). Il se produit alors, à 20°C, un lent remaniement moléculaire avec une remontée du pouvoir rotatoire qui se stabilise en 17 mn à -6° et ne varie plus, même après acidification du milieu. Il apparaît, dans ces conditions, 0,5 mmole de composé réducteur pour 10 mmoles d'acide déhydroascorbique initial, ainsi que 0,5 mmole d'acide oxalique.

II - DIENOLISATION DES PRODUITS DE DEGRADATION EN PRESENCE D'UN ACCEPTEUR D'ELECTRON

Nous avons vu qu'il apparaît spontanément dans les solutions d'acide déhydroascorbique évoluées sous atmosphère inerte une substance réductrice dont le comportement est similaire à celui de l'acide ascorbique. Par mole d'acide déhydroascorbique il se forme en moyenne 0,15 mole de composé réducteur en solution aqueuse à pH 3,2 et 0,05 mole en tampon phosphate 7,2. Cette substance semble résulter d'un équilibre tautomère céto-énolique. En effet, la présence d'un accepteur d'électron (iode) est susceptible de déplacer cet équilibre par oxydation du diénol engendré. Il apparaît, dans ces conditions, une molécule de composé réducteur par molécule d'acide déhydroascorbique à pH 3,2, en tampon phosphate 7,2 trois molécules. La cinétique a été étudiée sur des solutions d'acide déhydroascorbique maintenues à 37°C en présence d'un excès d'iode. L'iode consommé est dosé, par retour, par une solution de thiosulfate de sodium 0,1 N. Les résultats obtenus sont portés sur la fig.4. Il se forme, par molécule d'acide déhydroascorbique, une molécule de composé réducteur à pH 3,2 en 10 jours, trois molécules à pH 7,2 en 6 jours, la première structure diénolique apparaissant dans ce dernier milieu en moins de 8 heures.

Fig. 4



Diénolisation des produits de dégradation de l'acide déhydroascorbique (conc. initiale 10mM). I : à pH 3,2 - II : à pH 7,2.

III - NATURE DES PRODUITS FORMES

- Anhydride carbonique

L'anhydride carbonique présent dans les solutions d'acide déhydroascorbique dégradées a été isolé par entraînement à l'aide d'un courant d'azote dans une solution d'hydroxyde de baryum et dosé volumétriquement par acidimétrie.

En solution aqueuse non tamponnée (pH initial 3,2) il se forme par mole d'acide déhydroascorbique 0,17 mole d'anhydride carbonique, en tampon phosphate 7,2, 0, 05 mole, et après oxydation par deux équivalents d'iode 0,37 mole.

Les cinétiques de l'évolution d'anhydride carbonique et de la disparition concomitante de la structure diénolique de l'acide ascorbique dans les solutions de cet acide dégradées en tubes scellés à 70°C en atmosphère d'oxygène (air) permettent de relier les deux phénomènes comme en témoignent les résultats réunis dans le tableau 1 :

Temps (h)	H_2A (mole)	ΔH_2A (mole)	CO_2 (mole)
0	100	0	0
24	91	9	10
48	88	12	13
72	85	15	15
96	83	17	17
120	79	21	20

Tableau 1

Le rapport moléculaire du dégagement d'anhydride carbonique sur la disparition du diénol est en moyenne égal à 1.

- Oxyde de carbone

L'oxyde de carbone a été détecté dans l'atmosphère surmontant les solutions aqueuses d'acide ascorbique dégradées en tubes scellés et en présence d'oxygène à l'aide du réactif pallado-molybdique sur gel de silice. La recherche quantitative a été effectuée par la technique de microdiffusion de Conway (27).

L'oxyde de carbone a été retrouvé dans les dégagements gazeux accompagnant la dégradation autoxydative de l'acide ascorbique en solution aqueuse, excepté dans le cas où la dégradation est menée en tampon phosphate à pH 7,2. Il n'a pas été possible d'établir une relation stoechiométrique entre la destruction de l'acide ascorbique et l'évolution d'oxyde de carbone.

- Acide formique

Extrait à pH 1 du milieu réactionnel par l'oxyde d'éthyle exempt de peroxydes, l'acide formique a été caractérisé à l'état de formiate de sodium par la technique d'EEGRIWE (45) et dosé par la microméthode de GRANT (61).

Dans les solutions d'acide déhydroascorbique (10 mmoles) maintenues 60 mn à 37° C., il apparaît en tampon phosphate pH 7,2 0,4 mmole d'acide formique si la dégradation s'effectue sous atmosphère inerte et 0,1 mmole en présence d'oxygène. Le rendement est accru (1 mmole) après oxydation par six équivalents d'iode.

Il n'a pas été retrouvé d'acide formique dans les solutions aqueuses d'acide déhydroascorbique non tamponnées (pH initial 3,2).

- acide oxalique

Isolé en milieu acétique à l'état de sel de calcium, l'acide oxalique a été dosé par manganimétrie.

La présence d'acide oxalique n'a été décelée que dans les solutions d'acide déhydroascorbique dégradées à un pH supérieur à 9 ou en tampon phosphate.

La figure 5 représente la cinétique de la formation d'oxalate en tampon phosphate (0,067 M)de pH 7,2 à partir d'une solution d'acide déhydroascorbique (10 mmoles) maintenue à 37°C., sous atmosphère inerte.

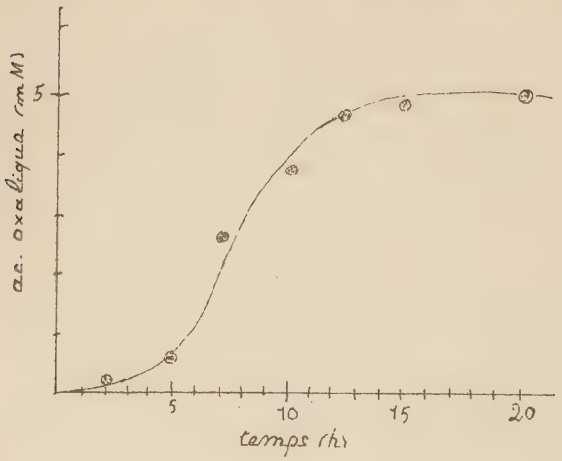


Figure 5 -
Cinétique de la formation d'acide oxalique à partir de l'acide déhydroascorbique (c = 10 mM) évolué en tampon phosphate 7,2.

En 16 heures, la quantité d'oxalate formée atteint sa valeur maximale (4,9 mmoles) et demeure constante (expérience menée sur 3 semaines). Il ne se forme qu'une molécule d'acide oxalique à partir de deux molécules d'acide déhydroascorbique. Les taux d'acide oxalique diminuent lorsqu'on opère dans les mêmes conditions sous oxygène (3,8 mmoles) ou en présence de deux équivalents d'iode (2,7 mmoles).

L'influence des concentrations relatives de phosphates et d'acide déhydroascorbique sur la formation d'oxalate a été étudiée à 37°C. sous atmosphère inerte pour des variations du rapport [phosphate] / [acide déhydroascorbique] comprises entre 1 et 6 (figure 6).

La formation d'acide oxalique est une réaction du second ordre relativement à la concentration en phosphates.

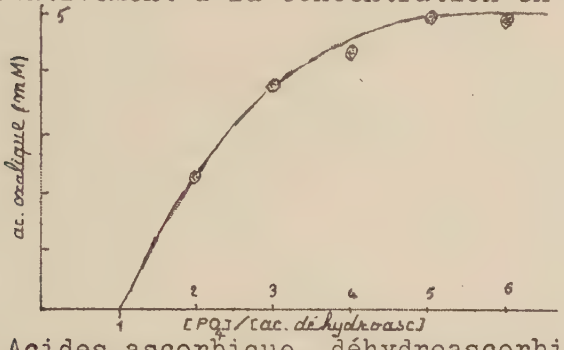


Figure 6 -
Influence de la concentration en ions phosphates sur la formation d'acide oxalique.

- Acides ascorbique, déhydroascorbique, dicétogulonique et autres cétoacides

Les acides ascorbique, déhydroascorbique et dicétogulonique ont été caractérisés directement par chromatographie ascendante sur papier Whatman N° 1, en atmosphère inerte, avec le solvant de MAPSON et PARTRIDGE (92), n-butanol-acide acétique-eau (4/1/5). Les spots sont révélés au nitrate d'argent ammoniacal par le réactif de TREVELYAN (136). L'acide ascorbique présente un Rf de 0,37, l'acide déhydroascorbique de 0,42 et l'acide dicétogulonique de 0,11.

Leur recherche peut être également effectuée (40) sous la forme de leurs bis - 2,4 - dinitrophénylhydrazones isolées par précipitation fractionnée, et caractérisées par chromatographie ascendante sur papier Arches 302 dans le système toluène - acétone - acide acétique 5 % (2/1/1) où elles migrent au Rf 0,76 (spot rouge).

Si l'acide dicétogulonique est un produit constant de la dégradation de l'acide déhydroascorbique en solution aqueuse, il ne nous a jamais été possible de retrouver l'acide ascorbique dans ces mêmes solutions, dégradées à 37°C, à l'abri de l'oxygène, en tampon phosphate 7,2 ou à pH 3,2. On peut donc exclure l'hypothèse (123) rattachant la formation de diénol à une réaction de dismutation de l'acide déhydroascorbique aboutissant à l'acide ascorbique.

Les 2-céto-acides ont été recherchés dans les 2,4-dinitrophénylhydrazones précipitées, à la température ordinaire, par la 2,4 - dinitrophénylhydrazine (DNPH) en solution à 2 % dans l'acide sulfurique 9 N. Les DNP - hydrazones des 2-céto-acides sont dissoutes sélectivement dans une solution 0,1 M de carbonate acide de sodium. La solution refroidie à 0°C. est acidifiée par l'acide chlorhydrique N et les DNP-hydrazones sont extraites par l'acétate d'éthyle. La phase organique, recueillie

par décantation, est déshydratée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide. Recristallisées dans un mélange à parties égales d'acétone et d'éthanol anhydre, les DNP-hydrazones isolées sont caractérisées par chromatographie sur papier : les systèmes solvants proposés par CAVALLINI et FRONTALI (21) sont utilisés pour séparer éventuellement les DNP - hydrazones des acides glyoxylique, mésoxalique et hydroxypyruvique; le solvant toluène-alcool isoamylique (2/1) permet de séparer par chromatographie ascendante sur papier acétylé Schleicher et Schull N° 2043b les DNP-hydrazones des acides 2-cétoxylonique (Rf = 0,61) et 2-cétogulonique (Rf = 0,68).

Il n'a pu être retrouvé aucun de ces 2-céto-acides dans les produits de dégradation de l'acide déhydroascorbique.

- Osones

Précipitées avec les 2-céto-acides par la DNPH en solution à 2 % dans l'acide sulfurique 9 N, les bis-DNP-hydrazones des osones se retrouvent dans la fraction insoluble après traitement par une solution aqueuse de carbonate disodique 0,1 M. Le résidu, lavé par l'acide chlorhydrique N et par l'eau distillée, est traité par l'éthanol à 95° qui dissout les mono-DNP-hydrazones. Il ne reste sur le filtre que les bis-DNP-hydrazones des structures osoniques, solubles dans l'éthanol-acétone. Leur caractérisatiom a été effectuée par chromatographie ascendante sur papier acétylé Schleicher et Schull N° 2043b en utilisant le nitrobenzène comme solvant de migration. Les spots, normalement jaunes, virent au bleu après pulvérisation d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N. La technique permet de séparer les DNP-hydrazones de la xylosone (Rf = 0,42), de la thréosone (Rf = 0,58), de la réductone (Rf = 0,86); à ce niveau toutefois peuvent interférer les structures isomères des DNP-hydrazones de la xylosone et de la thréosone dont les Rf sont compris entre 0,88 et 1.

En solution aqueuse (pH 3,2) l'acide ascorbique conduit, après autoxydation par l'oxygène moléculaire, par l'intermédiaire des acides déhydroascorbique et dicétogulonique, à la formation simultanée de L - xylosone et de L - thréosone. La L - thréosone apparaît seule dans les solutions d'acide déhydroascorbique évoluées en tampon phosphate 7,2, ou en présence de deux équivalents d'iode. Dans ces dernières conditions il se forme en même temps un produit dont la DNP-hydrazone migre en comète sur le chromatogramme entre les Rf 0 et 0,2 et qui n'a pu être identifié.

IV - INTERPRETATION DES RESULTATS

Nos observations confirment la nature hydrolytique du processus de dégradation, qui obéit à l'équation des réactions du premier ordre. La constante moyenne de vitesse ($k.mn^{-1}$ à 37°C.) est égale à 5.10^{-4} à pH 3,2, avec une demi-vie de 23 heures; elle est égale à 2.10^{-2} en tampon phosphate 7,2, avec une demi-vie de 35 mn. En présence d'un équivalent d'hydroxyde de sodium, $k.mn^{-1}$ à 20° est égale à 2 et la demi-vie de l'acide déhydroascorbique est de 20 secondes; dans ce cas, la variation du pouvoir rotatoire est parallèle à la disparition, déterminée chimiquement, du noyau lactonique, et aboutit en 180 secondes à une stabilisation à la valeur -25° (dicétogulonate de sodium). Par...

acidification, la valeur du pouvoir rotatoire passe à -18° (acide dicétogulonique). Ces résultats ne peuvent être valablement interprêtés par la théorie de GHOSH et RAKSHIT (cf. I-3), et seul le schéma de la délactonisation directe proposé par HERBERT et coll. semble devoir être conservé.

Nous avons précisé aussi que la formation du composé réducteur ne résulte pas d'une réaction de dismutation de l'acide déhydroascorbique. Le rapport moléculaire [composé réducteur formé] / [acide déhydroascorbique initial] qui devrait être, dans ce cas, théoriquement égal à 0,5, varie, suivant le pH, de 0,05 à 0,15. Par ailleurs l'acide ascorbique n'a jamais été caractérisé comme l'un des produits de la réaction et la comparaison des cinétiques (fig. 1, 2, 3, et 4) montre que la formation du diénol s'effectue plus lentement que l'ouverture du noyau lactonique.

La substance réductrice (première structure diénolique pour l'évolution en tampon phosphate) apparaît cependant sur la chaîne hexacarbonée. C'est ce qu'implique en effet la valeur, toujours égale à 1, du rapport moléculaire du dégagement d'anhydride carbonique sur la disparition du diénol au cours de l'autoxydation de l'acide ascorbique. La substance diénolique est en équilibre tautomère avec une forme cétolique non réductrice (la constante de l'équilibre diénol-cétolique est de 0,15 à 20°C. et à pH 3,2); l'équilibre peut être déplacé par un accepteur d'électron et la réaction est réversible par réduction à l'hydrogène sulfuré. Ces différentes observations nous font admettre que l'acide dicétogulonique (fig. 7 : b) est en équilibre avec sa forme tautomère, l'acide 3-diénol, 2-cétogulonique (fig. 7 : c), lequel peut s'oxyder en acide 2, 3, 4, - tricétogulonique (fig. 7 : d).

La dégradation non-desmolytique de l'acide déhydroascorbique est suivie d'une dégradation avec rupture du squelette carboné.

Nous avons confirmé la formation de L-xylosone au cours de la dégradation autoxydative de l'acide ascorbique à pH 3,2; à ce même pH, l'acide déhydroascorbique évolué en présence de deux équivalents d'iode conduit à la L - thréosone avec dégagement d'oxyde de carbone et d'anhydride carbonique. après hydrolyse de l'acide déhydroascorbique en acide dicétogulonique, il peut donc y avoir deux processus de dégradation, soit une décarboxylation avec formation de L - xylosone (fig. 7 : a), soit, par oxydation de la forme tautomère de l'acide dicétogulonique (fig. 7 : c), apparition de L - thréosone, d'oxyde de carbone et d'anhydride carbonique (fig. 7 : e)

La dégradation non oxydative de l'acide déhydroascorbique en tampon phosphate 7,2, conduit à l'acide oxalique comme l'a observé ROSENFELD (123). Le rapport moléculaire [acide oxalique formé] / [acide déhydroascorbique initial] est égal à 0,5, au rendement maximal, ce qui pourrait s'interprêter par une réaction de dismutation. Il ne semble pas possible cependant de retenir cette hypothèse, les acides glyoxylique ou 2-cétogulonique qui pourraient provenir d'une telle réaction n'ayant pu être retrouvés.

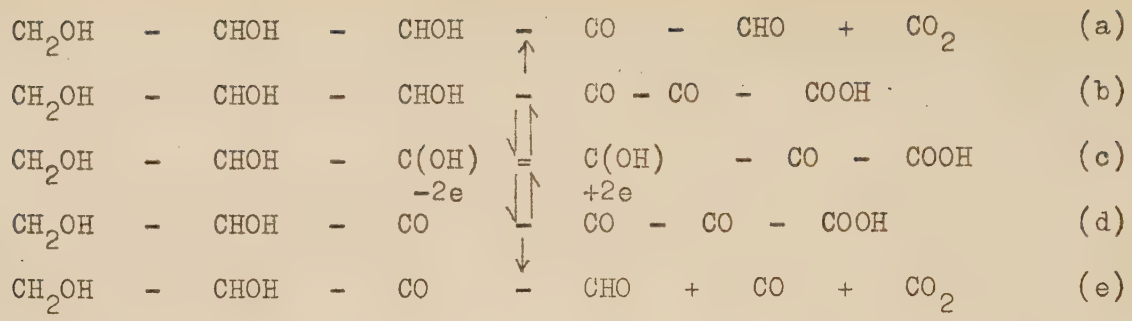


Figure 7

En tampon phosphate 7,2, on obtient successivement, par oxydation à l'iode de l'acide déhydroascorbique, trois structures diénoliques avec libération d'acide formique. Comme au cours de la dégradation à pH 3,2, le premier groupement diénolique engendré doit correspondre à l'acide 3-diénol, 2-cétogulonique, la L-thréosone se retrouvant dans les deux cas. La suite des réactions demeure hypothétique. On peut cependant envisager une tautomérisation à ce pH de la L-thréosone (seconde structure diénolique) qui conduirait, par dégradation oxydative, à la réductone (troisième structure diénolique).

Chapitre II - 3

S T A B I L I S A T I O N

Le nombre et la variété des stabilisants proposés dans la littérature (cf. chapitre I-4) nous ont incité à faire une étude comparée de l'efficacité de quelques protecteurs. A côté d'antioxygènes classiques - le sulfite acide de sodium et le gallate de propyle - notre choix, guidé à la fois par des considérations d'ordre théorique et toxicologique, s'est porté sur des sucres et des polyols, le chlorure de sodium, des chélateurs tels que l'acide citrique et l'éthylène diamine tétracétate disodique, des dérivés soufrés organiques.

I - MODE OPERATOIRE

Nous avons étudié parallèlement la dégradation de solutions d'acide ascorbique et d'ascorbate de sodium. Les solutions de ce sel ont été préparées en faisant réagir en solution aqueuse des quantités équimoléculaires d'acide ascorbique et de carbonate acide de sodium. Aux concentrations utilisées (10^{-1} M), les solutions d'acide ascorbique ont un pH de 2,66, celles d'ascorbate de sodium de 5,44. Le conditionnement a été réalisé en ampoules de 10 ml réparties en deux lots distincts, les premières étant scellées sous atmosphère d'oxygène (air), les secondes sous atmosphère d'azote. L'acide ascorbique a été titré par iodométrie.

La dégradation est provoquée par vieillissement accéléré à 60°C (température à laquelle la décomposition thermolytique est négligeable), dans une étuve "monocellule", pendant 96 heures. A cette température, et dans nos conditions expérimentales, la demi-vie de l'acide ascorbique sous atmosphère d'oxygène est de treize heures trente minutes. Le coefficient thermique de l'acide ascorbique établi à sa demi-vie entre 50 et 60°C étant égal à 2, on en déduit qu'un maintien à 60°C pendant 96 heures, correspond à un vieillissement de 64 jours à 20°C.

II - RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de l'étude de la dégradation des solutions d'acide ascorbique et d'ascorbate de sodium en présence des agents de stabilisation utilisés sont réunis dans le tableau 1. En dehors du dimercaptopropanol qui se révèle dans tous les cas un des produits les plus actifs mais dont on ne peut envisager l'utilisation en pratique, l'efficacité d'un agent stabilisant est conditionnée par le pH du milieu et la présence ou non d'oxygène moléculaire. En présence d'oxygène, la protection de l'acide ascorbique est assurée, dans l'ordre d'efficacité décroissante, par l'EDTA, le sulfite acide de sodium, l'acide citrique et le glucose, celle de l'ascorbate de sodium par l'EDTA, le glycérol, le chlorure de sodium et le fructose. En atmosphère d'azote, les meilleurs agents protecteurs de l'acide ascorbique sont le sulfite acide de sodium et le maltose, et pour l'ascorbate de sodium le glycérol, le chlorure de sodium et le fructose.

ANTIOXYDANTS		TAUX DE DESTRUCTION (%)			
Nature	Concentration (mM).	Acide ascorbique		Ascorbate de sodi	
		air	azote	air	azote
-	-	98,07	11,10	98,09	7,96
Chlorure de sodium	10	85,92	11,21	76,97	2,39
Acide citrique	10	80,55	11,15	87,20	5,60
EDTA	1	65,20	12,70	64,85	10,52
Sulfite acide de sod.	1	79,53	5,34	98,52	12,76
Gallate de propyle	1	87,20	8,41	81,38	7,88
Glucose	10	81,58	16,60	89,82	10,51
Fructose	10	90,02	10,84	78,25	3,40
Maltose	10	94,11	6,62	82,86	5,85
Saccharose	10	85,62	9,95	86,24	10,00
Glycérol	10	97,64	24,78	76,97	2,39
Thioglycérol	1	86,49	8,45	80,04	3,80
Acide thioglycolique	1	83,88	10,46	82,40	6,62
Thiourée	1	82,60	13,53	87,20	6,88
Dimercaptopropanol	1	80,30	3,82	71,85	2,39

Tableau 1

Influence des substances antioxydantes sur l'autoxydation de l'acide ascorbique ou de l'ascorbate de sodium (c = 100mM)

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

Il ressort de ces résultats que l'efficacité d'un conservateur dépend essentiellement des conditions expérimentales, en particulier du pH du milieu et de la présence ou non d'oxygène moléculaire dissous; l'action inhibitrice des substances étudiées peut cependant se rattacher à un même mécanisme si l'on considère qu'elles sont toutes susceptibles de former des complexes de coordination avec les ions cuivreux ou cuivriques catalyseurs de l'oxydation. Ainsi, connaît-on les chélates du cuivre bivalent avec les dérivés aminés, les oses, les polyols, les thiols, de même que les cupricitrates, les cupro et cuprichlorures alcalins et les cuprosulfites.

Le sulfite acide de sodium possède un effet fortement inhibiteur sur l'oxydation des solutions d'acide ascorbique et une activité nulle ou légèrement accélératrice sur les solutions d'ascorbate de sodium. Aux faibles concentrations utilisées, il semble difficile de pouvoir relier l'effet anti-oxydant aux propriétés réductrices de ce sel et il faut admettre que le complexe stabilisateur ne peut se former qu'au pH de la solution acide (pH 2,66) et non à celui de la solution saline (pH 5,44). Le phénomène inverse observé avec le chlorure de sodium s'explique aussi par la formation d'un complexe stabilisateur uniquement au pH de la solution saline.

Deux oses, le glucose et le maltose, se révèlent des anti-oxydants efficaces pour l'acide ascorbique en solution aqueuse (pH 2,66). Si l'on considère les formules développées (fig. 1) ces deux sucres possèdent un groupement commun cis - α - dihydroxyle, l'un des hydroxyles (C_1) appartenant à la fonction pseudoaldéhydique, l'autre (C_2) à la fonction alcool secondaire en α. L'action retardatrice exercée par le glycérol et le fructose sur l'autoxydation des solutions d'ascorbate de sodium laisse également place à l'hypothèse d'une chélation du cuivre au niveau d'un groupement cis - α - dihydroxyle (en C_4-C_5 pour le fructose), les deux hydroxyles appartenant alors à des fonctions alcooliques (structure α - glycolique). Par contre, le saccharose, qui ne possède aucune des deux positions privilégiées, ne présente dans les deux cas qu'une faible activité anti-oxydante.

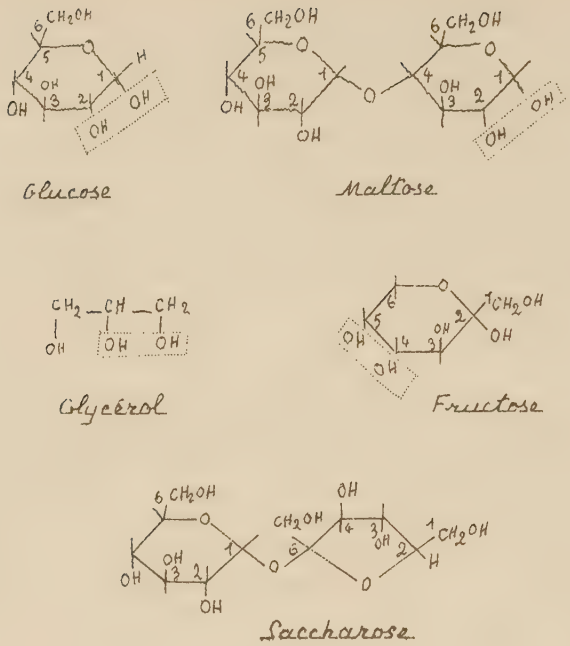


Figure 1 -

Un des phénomènes importants constatés est l'inversion des effets catalytiques exercé par l'éthylène diamine tétracétate disodique (EDTA) en fonction de la concentration en oxygène moléculaire. En effet, si en présence d'un excès d'oxygène, l'EDTA possède une action nettement retardatrice sur l'oxydation de l'acide ascorbique ou de son sel de sodium, sous atmosphère inerte mais en présence de traces inévitables d'oxygène, prédomine au contraire une action accélératrice. Cet effet n'est pas spécifique de l'EDTA, il s'observe avec d'autres substances et notamment le glucose.

Il existe aussi des phénomènes d'inversion catalytique, non plus en fonction de la concentration en oxygène, mais en fonction du pH : le sulfite acide de sodium, anti-oxydant puissant à pH 2,66 se révèle pro-oxydant à pH 5,44. Le glycérol, par contre, qui à pH 5,44 est un inhibiteur efficace du processus d'autoxydation, l'active à pH 2,66. On peut appliquer à ces phénomènes paradoxaux d'inversion catalytique le commentaire de DUFRAISSE (42) : "non seulement un catalyseur peut inverser son action quand on l'oppose à divers corps, mais il peut agir aussi bien dans les deux sens sur l'oxydation d'un même corps, suivant les conditions expérimentales. Ainsi, le sens positif ou négatif de la catalyse est réglé pour certains catalyseurs par le pH du milieu où se produit l'oxydation".

Si le renversement du sens de l'action catalytique suivant le pH du milieu peut être lié à une plus ou moins grande stabilité des complexes métalliques en fonction de la concentration en ion hydrogène, l'influence des concentrations en oxygène sur l'inversion catalytique ne saurait s'expliquer que si les mécanismes intimes de l'autoxydation étaient connus. Les différentes théories qui s'affrontent (cf. chapitre I-2) rendent compte avant tout de la complexité et sans doute de la

diversité des processus. Nos résultats permettent d'envisager deux mécanismes possibles de l'autoxydation de l'acide ascorbique, suivant la présence d'un excès ou de trace d'oxygène moléculaire, si l'on sait que la présence d'oxygène est le plus souvent inhibitrice des oxydations par réaction en chaîne (138).

En présence d'un excès d'oxygène, l'autoxydation de l'acide ascorbique s'effectue sans intervention de chaîne, uniquement par transfert d'électron de la fonction diénol à l'ion cuivrique qui joue le rôle, sous sa forme réduite, de mobilisateur de l'oxygène moléculaire, comme nous l'avons vu dans le chapitre I-2. La catalyse négative exercée dans ce cas par l'EDTA peut s'expliquer,

a) par l'action compétitive sur le cuivre de la structure α -diaminée de l'EDTA et du diénol, les complexes aminés du cuivre étant plus stables que les chélates fournis avec ce métal par les groupements hydroxyles (94),

b) par une inhibition des radicaux libres hydroxyles propagateurs de chaîne, libérés au cours de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'ion cuivreux (mécanisme d'HABER - WEISS (66), inhibition que nous avons récemment démontrée (24).

Si l'action conjointe de ces deux mécanismes permet d'expliquer les effets stabilisants de l'EDTA en présence d'oxygène, comment ce même agent peut-il favoriser l'autoxydation lorsque l'oxygène ne se trouve plus qu'à l'état de trace ? Le processus de dégradation oxydative semble se développer dans ce cas par une réaction en chaîne, dans laquelle interviennent des radicaux libres perhydroxyles ou peroxyascorbyles, comme nous l'avons vu dans le chapitre I-2. Les ions cuivriques sont connus pour être des agents puissants de rupture de chaîne (138) vingt fois plus actifs notamment que les ions ferriques (8); ils sont donc susceptibles de décomposer les radicaux libres perhydroxyles, propagateurs de chaîne, avec évolution d'oxygène moléculaire, suivant l'équation :

$$HO_2\cdot + Cu^{2+} \longrightarrow Cu^{+} + H^{+} + O_2$$

L'effet pro-oxydant de l'EDTA s'explique alors si l'on admet qu'il est susceptible d'inhiber cette désactivation exercée par le cuivre de la même façon qu'il inhibe la décomposition du peroxyde d'hydrogène.

Chapitre II - 4

DISCUSSION DES RESULTATS

Sans reprendre dans ce chapitre l'interprétation physico-chimique de nos résultats expérimentaux, nous envisagerons ici leur portée pratique, plus particulièrement en ce qui concerne la stabilisation de l'acide ascorbique en solution aqueuse.

En atmosphère inerte, l'acide ascorbique se dégrade en donnant de l'anhydride carbonique, du furfural et du xylose. La réaction est du premier ordre ($k.\ h^{-1} = 157.\ 10^{-4}$ à 100°C ; $Q_{10} \sim 2$). A 100°C, la demi-vie de l'acide ascorbique est de 44 h. Cette réaction ne s'effectue que pour des pH inférieurs à 5. Ainsi, le furfural ne peut être détecté dans des solutions aqueuses d'ascorbate de sodium (c = 100 mM; pH 5,44)après maintien à 100°C pendant 24 h; dans les mêmes conditions l'acide ascorbique (c = 100 mM; pH 2,66) conduit à 10 mM de furaldéhyde.

Si en atmosphère inerte l'ascorbate de sodium est beaucoup plus stable que l'acide ascorbique, il n'en est pas de même en présence d'oxygène. A 60°C par exemple, pour des concentrations de 10^{-1}M, la demi-vie de l'ascorbate de sodium est de 4 h.50 mn, celle de l'acide ascorbique de 13 h.30 mn.

Le premier stade accessible de l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène moléculaire est l'acide déhydroascorbique. L'acide déhydroascorbique, lui-même instable, subit par processus hydrolytique une délactonisation qui conduit à l'acide 2,3-dicétogulonique. La vitesse d'ouverture du noyau lactonique est variable avec le pH (à 37°C,$k.mn^{-1}$ est de $5.\ 10^{-4}$ à pH 3,2, de $2.\ 10^{-2}$ à pH 7,2, la durée de demi-réaction étant de 23 h. à pH 3,2, de 35 mn à pH 7,2).

Si le processus de dégradation de l'acide déhydroascorbique est relativement simple (nos résultats ayant permis d'exclure un mécanisme dégradatif par céto-énolisation préalable ou par dismutation) il n'en est plus de même au niveau de l'acide 2,3-dicétogulonique. A ce stade nous avons pu observer trois processus différents (décarboxylation, tautomérisation et cétolysation). Les demi-vies de l'acide 2,3-dicétogulonique (valeurs calculées) sont, en présence d'iode comme accepteur d'électron, de 49 h. à pH 3,2, de 2 h.30 mn à pH 7,2; la demi-vie est de 7 h. à ce même pH et sans accepteur d'électron.

En milieu acide, l'acide dicétogulonique se dégrade en anhydride carbonique et L-xylosone (processus décarboxylatif). Il se forme également par cétol-diénolisation (processus tautomérique) l'acide 3-diénol, 2-cétogulonique. Ce dernier peut céder deux électrons à un accepteur en donnant l'acide 2,3,4-tricétogulonique qui se décompose en L-thréosone oxyde de carbone et anhydride carbonique. En tampon phosphate et à pH 7,2, il apparaît en atmosphère inerte de l'acide oxalique (processus cétolytique); les ions phosphates sont indispensables à la réaction (réaction du second ordre relativement à la concentration en ions phosphates). En présence d'un accepteur d'électron, on assiste à une diminution du rendement en acide oxalique, à une formation étagée de trois structures diénoliques réductrices, et à une libération d'acide formique.

L'ensemble de ces résultats est schématisé dans la figure 1

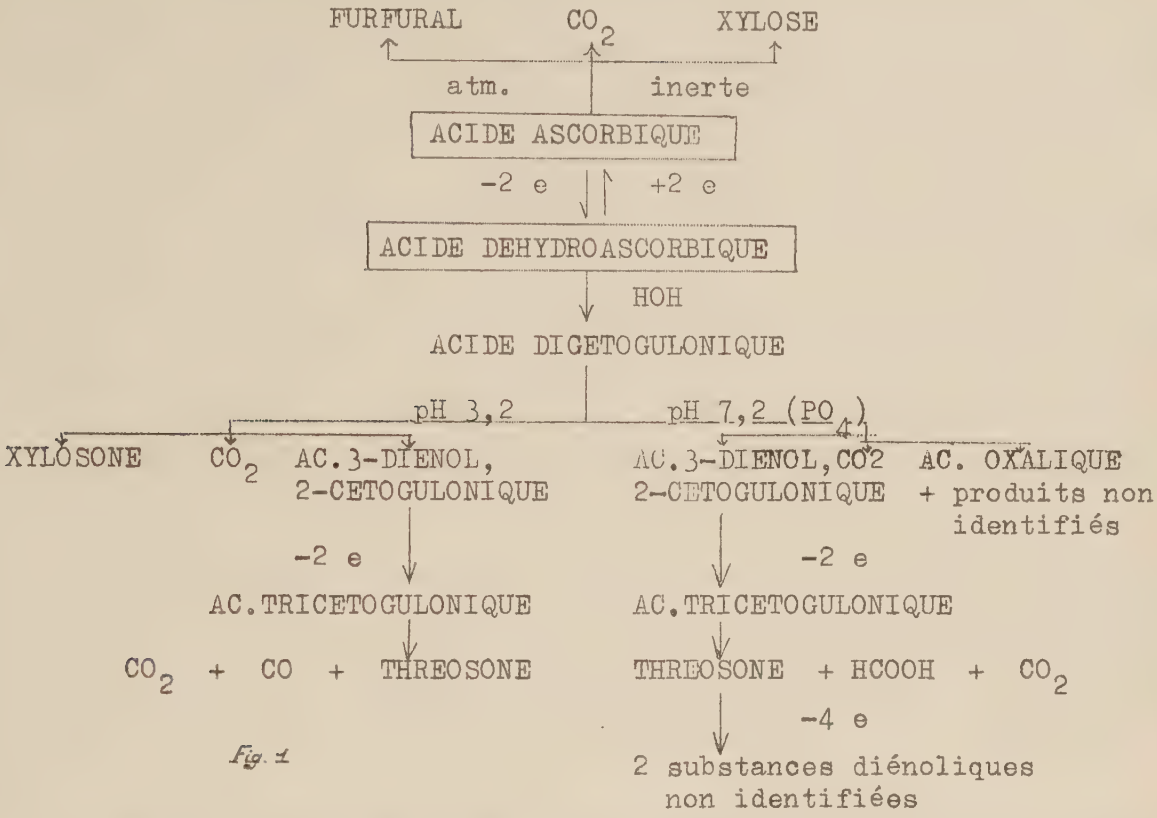


Fig. 1

L'emploi d'une atmosphère inerte (azote) est une des conditions indispensables pour assurer la conservation des solutions aqueuses d'acide ascorbique. L'eau solvante elle-même doit être préalablement désoxygénée et exempte au maximum d'ions cuivriques, catalyseurs d'oxydation (les eaux traitées par les résines échangeuses d'ions ou distillées dans des appareils de silice sont les plus satisfaisantes). Il faut encore vérifier l'inertie chimique du verre des ampoules, l'utilisation de verres colorés est à éviter.

Sous atmosphère inerte, l'ascorbate de sodium est plus stable que l'acide ascorbique et son emploi permet la tyndallisation ou même la stérilisation des ampoules de solutés injectables, sans craindre une dégradation thermolytique avec formation d'anhydride carbonique et de furfural comme c'est le cas pour les solutions d'acide ascorbique. L'utilisation d'un système tampon (tampon phosphate) est à déconseiller, les ions phosphates provoquant une décomposition catalytique de l'acide 2,3-dicétogulonique en acides formique et oxalique.

Il est nécessaire enfin d'ajouter aux solutions d'ascorbate de sodium une substance antioxydante pour enrayer l'effet dû à la présence inévitable de traces d'oxygène. De faibles quantités de glycérol dans le cas des solutés buvables ou de chlorure de sodium dans le cas des solutés injectables assureront une protection efficace.

C O N C L U S I O N S

Les recherches qui ont été développées dans ce travail ont trait à la dégradation et à la stabilisation de l'acide ascorbique en solution aqueuse. Elles nous amènent aux conclusions suivantes :

A - DEGRADATION

Nous avons montré que la dégradation de l'acide ascorbique peut s'effectuer suivant deux processus.

I - En atmosphère inerte, l'acide ascorbique se décompose en furfural, L-xylose et anhydride carbonique, selon une réaction du premier ordre. A 100°C, la constante de vitesse est égale à $157. 10^{-4}$ h^{-1}. Le coefficient thermique de la réaction est voisin de 2. La dégradation est influencée par le pH, et ne se produit d'une façon appréciable que pour des pH inférieurs à 5. L'ascorbate de sodium est stable dans ces conditions.

II - En présence d'oxygène, le premier stade de l'oxydation de l'acide ascorbique accessible chimiquement est l'acide déhydroascorbique, qui subit une ouverture hydrolytique de sa fonction lactone sous contrainte avec formation d'acide 2,3-dicétogulonique. La vitesse de délactonisation varie avec le pH; à pH 3,2 et à 37°C, la constante de vitesse est égale à $5. 10^{-4}$ mn^{-1}, à pH 7,2 à $2. 10^{-2}$ mn^{-1}.
L'acide 2,3-dicétogulonique est lui-même très instable. Les produits de décomposition sont de nature différente suivant le pH.

1) A pH 3,2, l'acide dicétogulonique peut, soit se décarboxyler et former de la L-xylosone, soit exister en équilibre avec sa forme tautomère l'acide 3-diénol, 2-cétogulonique. L'équilibre peut être déplacé par un accepteur d'électron avec formation finale de L-thréosone, oxyde de carbone et anhydride carbonique.

2) A pH 7,2, en tampon phosphate et à l'abri de l'oxygène, l'acide dicétogulonique se décompose en acide oxalique. Au rendement maximal il se forme une molécule d'acide oxalique pour deux molécules d'acide dicétogulonique initial. Les ions phosphates sont indispensables à la réaction. En présence d'un accepteur d'électron, il apparaît successivement trois composés réducteurs de structure diénolique. On observe alors une diminution du rendement en acide oxalique et une libération d'acide formique.

B - STABILISATION

La dégradation de l'acide ascorbique par mécanisme autoxydatif peut être ralentie par l'emploi de substances antioxydantes. Leur efficacité dépend des conditions expérimentales, notamment du pH du milieu et de la présence , soit d'un excès, soit de traces d'oxygène.

I - En présence d'un excès d'oxygène (conditionnement en atmosphère d'air), l'éthylène diamine tétracétate disodique est un bon protecteur , aussi bien pour les solutions d'acide ascorbique que d'ascorbate de sodium.

II- Sous atmosphère inerte (conditionnement sous azote), le sulfite acide de sodium est l'antioxydant le plus actif pour les solutions d'acide ascorbique. L'ascorbate de sodium,beaucoup plus stable, peut être protégé par l'addition de faibles quantités de glycérol ou de chlorure de sodium.

Le Président de la Thèse :
Monsieur le Professeur DREVON

VU et permis d'imprimer
Lyon, le 20 Janvier 1960

VU, le Doyen :
H. HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,
André ALLIX

B I B L I O G R A P H I E

1 - ALBERS (H.), MULLER (E.) - Naturwissenschaften, 1959, 46, 75-76.

2 - ARMENTO (A.) - Biochem. Z., 1941, 307, 270.

3 - BALL (E.G.) - J. biol. Chem., 1937, 118, 219-239.

4 - BANDELIN (F.J.), TUSCHHOFF (J.V.) -J. am. pharm. Assoc.,1955,44,241-244.

5 - BARR (N.F.), KING (C.G.) - J. am. chem. Soc., 1956, 78, 303-305.

6 - BARRON (E.G.), DE MEIO (R.H.), KLEMPERER (F.) - J. Biol. chem; 1936, 112, 625-640.

7 - BARTILUCCI (A.) FOSS (N.E.) - J. am. pharm. Assoc., 1954,43, 159-162.

8 - BAXENDALE (J.H.) - Advances in Catalysis, 1952, 4 , 31-86.

9 - BEEVERS (H.) - Plant Physiol., 1954, 29, 265-269.

10 - BEZSSONOFF (N.) LEROUX (H.)- Bull. Soc.Chim.biol., 1946,28, 286-300.

11 - BEZSSONOFF (N.) WOLOSZYN (M.) - C.R. Acad. Sci., 1936, 203, 275.

12 - BEZSSONOFF (N.) WOLOSZYN (M.) - C.R.Soc. Biol., 1937, 125, 884.

13 - BEZSSONOFF (N.) WOLOSZYN (M.) LEROUX (H.) - Z. Vitaminforsch., 1943, 13, 37.

14 - BIRCH (T.W.) HARRIS (L.J.) - Biochem. J., 1933, 27, 595-599.

15 - BORSOOK (H.), DAVENPORT (H.W.), JEFFREYS (C.E.P.), WARNER (R.C.) J. Biol.chem., 1937, 117, 237-279.

16 - BORSOOK (H.) KEIGHLEY (G.) - Proc. Nat. Acad. Sc., 1933, 19, 875.

17 - CAMPBELL (J.), TUBB (W.G.) - Can. J. Research., 1950, 28E, 19-32.

18 - CANCE Mc (R.A.) - Biochem. J., 1926, 20, 1.111-1.113.

19 - CARAWAY (W.T.), HELLERMAN (L.) - J. am. chem. Soc., 1953, 75,5334-40.

20 - CARPENI (G.) - Thèse de Sciences, Paris,1938.

21 - CAVALLINI (D.) FRONTALI (N.) - Biochim. biophys. Acta., 1954, 13, 439-445.

22 - CHAPON (L.) CHAPON (S.), GENTY-AIME (N.), URION (E.) - Bull. Soc. chim., 1959, 81-88.

23 - CHAPON (L.) CHAPON (S.), URION (E.) -Bull. soc. chim. 1959, 856-61.

24 - CIER (A.), NOFRE (C.) - Bull. soc. Chim. 1959, 1523-1530.

25 - CIER (A.) NOFRE (C.) DREVON(B.) - Bull.Soc. Chim., 1959, 74-77.

26 - CIER (A.) NOFRE (C.) REVOL (A). - C.R. Acad. Sci., 1958,247, 542-544.

27 - CONWAY (E.J.) - Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 3ème éd. , Crosby Lokwood and Son, Londres, 1950.

28 - COX (E.G.), GOODWIN (T.H.) - J. Chem. Soc. 1936, 769.

29 - COX (E.G.), HIRST (E.), REYNOLDS (J.) - Nature, 1932, 130, 888.

30 - CROOK (E.M.) - Biochem. J., 1941, 35, 226.

31 - CSUROS (Z.), PETRO (J.) - Acta chim. Acad. Sci. hungar., 1955, 7, 199-220.

32 - DALGLIESH (C.E.) - Arch. biochem. biophys., 1955, 58, 214 -226.

33 - DAMANSKI (A.F.), MIRIC (M.O.) - Glasnik Khem. Drushtva Beograd, 1955, 20, 557.

34 - DEKKER (A.O.), DICKINSON (R.G.), - J. am. chem. Soc., 1940, 62, 2165-71.

35 - DELGADO (J.N.), LOFGREN (F.V.), BURLAGE (H.M.) - Drug Standards, 1958, 26, 51-56.

36 - DODDS (M.L.) - Arch. biochem., 1948, 18, 51-58.

37 - DOLDER (R.) - Pharm. Acta. Helv., 1952, 27, 54-70.

38 - DOLGOPLOSK (B.A.), TINIAKOVA (E.I.) - J. Polymer. Sci., 1958, 30, 315-330.

39 - DOUZOU (P.) Thèse de Doctorat ès Sciences, LYON, 1959.

40 - DREVON (B.), NOFRE (C.) CIER (A.)- C.R. Acad. Sci., 1956, 243, 607-9

41 - DREVON (B.), NOFRE (C.) CIER (A.) - Ann.Pharm. fr., 1958, 16, 495-503.

42 - DUFRAISSE (C.) - In Traité de Chimie Organique de GRIGNARD, Ed. MASSON 1936, 2, fasc. 2, p. 1157.

43 - DUNN (F.J.), DAWSON (C.R.) - J. Biol. Chem. 1951, 189, 485-497.

44 - EDSALL (J.T.), SAGAL (E.L.) - J. am. chem. Soc., 1943, 65, 1312.

45 - EEGRIWE (E.) - Z. anal. Chem. 1937, 110, 22.

46 - EISTERT (B.) - Angew. Chem. 1954, 66, 160.

47 - ERDEY (L.), BODOR (A.) - Fresenius Z. analyst. Chem. 1952, 136, 109-114.

48 - EULER (H.v.) EISTERT (B.) - Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate, 1957, Ferdinand Enke, Verlag, Stuttgart.

49 - EULER (H.v.), HASSELQUIST (H.) - Arkiv., 1952, 5, N° 5, 50.

50 - FILSON (G.W.), WALTON (J.N.) - J. phys. Chem., 1932, 36, 740, cité par Barron (6)

51 - GASPAR (N.J.), LOS (J.M.) - Can. J. Chem. 1959, 37, 495-497.

52 - GEORGESCU (I.D.) - J. Chim. phys. 1932, 29, 217.

53 - GERBER (C.F.) HETZEL (C.P.) KLIOZE (O.) LEYDEN (A.F.) - J. am. pharm. assoc., 1957, 46, 635-639.

54 - GERO (E.) - C.R. Acad. Sci., 1952, 235, 397-399.

55 - GERO (E.) - C.R. Acad. Sci, 1942, 236, 541-543.

56 - GERO (E.), LE GALLIC (P.) - Bull. Soc. Chim. biol. 1952, 34, 548-56.

57 - GHOSH (J.C.), RAKSHIT (P.C.) - Biochem. Z., 1936, 289, 15.

58 - GHOSH (J.C.), RAKSHIT (P.C.) - Biochem. Z., 1938, 299, 394-405.

59 - GIRAL (F.) - J. am. pharm. Assoc. 1947, 36, 82-84.

60 - GIROUD (A.), GERO (E.) - Bull. Soc. Chim. biol., 1938, 21, 1022.

61 - GRANT (W.M.) - Anal. Chem., 1948, 20, 267-269.

62 - GREEN (D.E.) - Biochem. J., 1933, 27, 1044-1048.

63 - GUILD (L.P.), LOCKHART (E.F.), HARRIS (R.S.) - Science, 1948, 107, 226-227.

64 - GUILLEMET (R.) - Bull. soc. Chim. biol. 1942, 24, 186-190.

65 - GUINAND (S.) - C.R. Acad. Sci., 1941, 213, 1003.

66 - HABER (F.), WEISS (J.) - Proc. Roy. soc. 1934, A147, 332.

67 - HALDEN (W.), SCHAUENSTEIN (E.) - Z. Vitamin. Hormon. u. Fermentforsch, 1950, 3, 181-196.

68 - HAWORTH (W.M.), HIRST (E.L.) - in MELLAMBY (E.) RUZICKA (L.) Ergebnisse der Vitamin und Hormonforschung, 1939, 2, 160.

69 - HEARD (R.D.), WELCH (A.) - Biochem. J., 1935, 29, 998.

70 - HERBERT (R.W.), HIRST (E.L.), PERCIVAL (E.G.V.), REYNOLDS (R.J.W.), SMITH (F.) - J. chem. soc., 1933, 1270.

71 - HINSBERG (K.) - Biochem. Z., 1937, 290, 125.

72 - HOTZEL (A.) - Scient. Pharm. 1941, 12, 13.

73 - JAGER (E.) - Pharmazie, 1948, 3, 530-537.

74 - JENSEN (F.F.) - Dansk. Tidsskr., 1955, 29, 125-152.

75 - JOSLYN (M.A.), MILLER (J.) - Food Research, 1949, 14, 325-363.

76 - KARRER (P.) SALOMON (H.), MORFU (R.), SCHOFP (K.) - Biochem. Z., 1933, 258, 4.

77 - KARRER (P.), SCHWARZENBACH (G.), SCHOPP (K.) - Helv. chim. Acta, 1933, 16, 302.

78 - KAUFFMANN (H.J.) - J. amer. chem. Soc., 1951, 73, 4311-4314.

79 - KEDVESSY (G.) - Ber. ung. pharm. ges., 1943, 19, 62.

80 - KELLIE (A.E.), ZILVA (J.S.) - Biochem. J., 1935, 29, 1029-1035.

81 - KENYON (J.), MUNRO (N.) - J. chem. Soc. 1948, 158-161.

82 - KERN (M.), RACKER (E.) - Arch. biochem. biophys. 1954, 48, 235-236.

83 - KERSTEN (H.), KERSTEN (W.), STAUDINGER (H.J.) - Biochem. Z., 1956, 328, 24-34.

84 - KERSTEN (H.) KERSTEN (W.), STAUDINGER (H.J.) - Biochim. biophys. Acta, 1958, 27, 598-608.

85 - KERSTEN (H.), LEONHAUSER (S.), STAUDINGER (H.J.) - Biochim. biophys. Acta, 1958, 29, 350-358.

86 - KUHLER (W.D.), DANIELS (T.C.) - J. am. chem. soc., 1935, 57, 1929-30.

87 - LAKI (K.) - Z. physiol. Chem., 1933, 217, 54.

88 - LIBERALLI (C.H.) - Anais Fac. Farm. e Odontol., 1950, 8, 121-126.

89 - LISSITZKY (S.), ROQUES (M.) - Bull. soc. Chim. biol. 1957, 29, 521-37.

90 - LYMAN (C.M.), SCHULTZE (M.O.) KING (C.G.) J. biol. chem. 1937, 118, 757-764.

91 - MAPSON (L.W.) - Biochem. J., 1941, 35, 1332.

92 - MAPSON (L.W.), PARTRIDGE (S.M.) - Nature, 1949, 164, 479-480.

93 - MARRE (E.), ARRIGONI (O.) - Biochim. biophys. Acta, 1958, 30, 453.

94 - MARTELL (A.E.), CALVIN (M.) - Chemistry of the metal chelate Compounds, Prentice-Hall, 1952, 169-170.

95 - MARX (T.) - Landwirsch. Forsch. 1951, 2, 229-234.

96 - MAYER (A.M.) - Nature, 1957, 180, 1417-1418.

97 - MEIBAUM (U.V.) - Gigiena i Sanit. 1950, N° 4, 35-37.

98 - MERCK INDEX of Chemicals and Drugs, Merck & Co. Inc. Rahway, N.J., U.S.A., 1952, Ed. 6, 872.

99 - MICHEEL (F.), KRAFT (K.) - Hoppe. Seyler's Z. Physiol. chem. 1933, 215, 215.

100- MILITZER (W.E.) - J. Biol. chem. 1945, 158, 247.

101- MOLL (T.), WIETERS (H.) - E. Merck's Jahresber., 1936, 50, 65.

102- MOUBASHER (R.) - J. biol. chem. 1948, 176, 529-534.

103- NASON (A.), WOSILAIT (W.D.) TERREL (A.J.) - Arch. biochem. biophys. 1954, 48, 233-235.

104- NATH (M.C.), BHATTATHIRY (E.P.M.) - Nature, 1955, 176, 787-88.

105- NEIADAS (E.), ROBERT (L.) - Bull. Soc. Chim. biol. 1958, 40, 347-59.

106- NIKOLAEV (A.) - Vestnik Moskov. Univ. 1947, N° 1, 71-77.

107- NIKOLAEV (A.),- Vestnik Moskov. Univ. 1947, N° 7, 147-154.

108- NOFRE (C.) CIER (A.), DREVON (B.) - C. R. Acad. Sci., 1958, 246, 1611-1613.

109- NOFRE (C.), CIER (A.), DREVON (B.) - Bull. Soc. chim. 1960, 259-263.

110- NOMURA (D.), UEHARA (Y.) - Hakko Kogaku Zasshi, 1958, 36, 290-96.

111- NORD (H.) - Acta Chem. scand. 1955, 9, 442-454.

112- OHLE (H.), EHRLBACH (H.) - Ber. deut.chem. ges., 1934, 67, 555.

113- PECHERER (B.) - J. am. chem. Soc. 1951, 73, 3827-3830.

114- PENNEY (J.R.), ZILVA (S.S.) - Biochem. J., 1943, 37, 39.

115- PENNEY (J.R.), ZILVA (S.S.) - Biochem. J., 1943, 37, 403.

116- PERROT (L.) - Thèse de pharmacie, Lyon, 1943.

117- PETERSON (R.W.); WALTON (J.H.) - J. am. chem. soc. 1943, 65, 1212-17.

118 - PETUELY (F.) - Monatschefte für Chemie, 1952, 83, 765-775.

119 - PONTING (J.D.) - Ind. Eng. Chem. Anal. 1943, 15, 389.

120 - RAKSHIT (P.C.), SEN (B.C.), BHATTACHARYVA (P.K.) - J. indian. Chem. Soc. 1957, 34, 668-672.

121 - REVOL (A.), NOFRE (C.), CIER (A.) - C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 2486-88.

122 - RICHARDSON (J.E.), MAYFIELD (HH.) - Montana State College Bull.1940 423, 1-20.

123 - ROSENFELD (B.) - J. biol. chem. 1943, 150, 281-303.

124 - SCHAUENSTEIN (E.), OCHSENFELD-LOHR (I.), PUXKANDL (H.), STAMFER (M.) Monastsh., 1948, 79, 487-498.

125 - SCHEINKMANN (E.A.) - Chem. Z., 1941, 1187.

126 - SHIMOSAKA (K.) - Osaka Daigaku Igaku Zassi, 1957, 9, 37-44.

127 - SHNAIDMAN (L.O.) - Trudy Vsesoyuz Nauch Issledovatel. Vitamin. Inst., 1953, 4, 47-53.

128 - STADELMANN (R.) - Schweiz. Apoth. Ztg. 1947, 85, 865-866.

129 - STOTZ (E.), HARRER (C.), KING (C.G.),- J. Biol. Chem. 1937, 119,511.

130 - STROHECKER (R.), MATT (Fr.) - Z. Anal. Chem. 1951, 133, 342-346.

131 - SUMIKI (Y.), HAYASHI (H.) - J. agr. Chem. Soc. Japan, 1949, 23,1-5.

132 - SUMIKI (Y.) YAMAMOTO (K.), SATAKE (K.) - J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1951,25, 178-180.

133 - SUSIC (M.V.) - Bull. Inst. Nuclear. Sci., 1955, 5, 65-69.

134 - TERAO (K.), SAKASHITA (T.) - Brev. Japon, 1953, N° 4948.

135 - TOMOCHI (M.), MIKI (T.) AWATA (E.) - Yakuzaigaku, 1956, 16, N° 3, 27-30.

136 - TREVELYAN (W.E.) PROCTER (D.P.), HARRISON (J.S.) - Nature, 1950, 166, 444-445

137 - UDENFRIEND (S.), CLARK (C.T.), AXELROD (J.), BRODIE (B.B.) - J.biol. Chem., 1954, 208, 731-739.

138 - URI (N.) - Chem. Rev., 1959, 50, 375-454.

139 - UTSUMI (I.), TANAKA (M.), HARADA (K.), USUKI (T.), KUSU (N.) - Brev. Japon, 1957, 19 oct., N° 8946.

140 - VACHER (M.), LORTIE (Y.) - C.R. Acad. Sci., 1941, 213, 726.

141 - VAVRIN (Z.) - Coll. Czech. chem. Comm., 1949, 14, 367.

142 - VONESCH (E.E.), REMEZZANO (A.L.) - Quart. J. Pharm. Pharmacol. 1942, 15, 180.

143 - WEISSBERGER (A.) LU VALLE (J.E.),THOMAS (D.S.)- J.am.chem. Soc,1943 65, 1934.

144 - WEISSBERGER (A.),LU VALLE (J.E.) -J.am. chem. Soc.,1944, 66,700-5.

145 - WILLIAMS (D.) ROGERS (L.H.) - J. am. chem. Soc., 1937, 59, 1422.

146 - WURMSER (R.), DE LOUREIRO (J.A.) - J. Chim. phys., 1934, 31, 419.

TABLE DES MATIERES

- INTRODUCTION page 2

- PARTIE I : Généralités 3

Chapitre I-1 : Propriétés physico-chimiques de l'acide L-ascorbique 5

Chapitre I-2 : Facteurs d'oxydation et mécanisme 9

Chapitre I-3 : Dégradation 14

Chapitre I-4 : Stabilisation 19

- PARTIE II : Travail personnel 21

Chapitre II-1 : Dégradation en atmosphère inerte 23

Chapitre II-2 : Dégradation oxydative 30

Chapitre II-3 : Stabilisation 39

Chapitre II-4 : Discussion des résultats 44

- CONCLUSION 47

- BIBLIOGRAPHIE 49

o

o o

o